Untersuchungen zum Einfluss von ^{211}At, ^{188}Re und Doxorubicin auf die DNA-Schädigung humaner Lymphozyten

Dissertationsschrift

zur Erlangung eines doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von

Roswitha Runge

aus Dresden

Dresden 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. G. Wunderlich

2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Dörr

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Oktober 2009

gez.: Prof. Dr. med. G. Wozel
Vorsitzender der Promotionskommission

1. Einleitung 1

1.1 Nuklearmedizinische Therapie und deren Wirkung 1

1.2 Biologische Effekte ionisierender Strahlung 1

1.3 Ursachen für DNA-Schäden 3

1.4 DNA-Reparatur 4

1.5 Detektion von DNA-Schäden und Zellüberleben 5

1.6 Ziele der Arbeit 9

2. Material und Methode 11

2.1 Biologisches Testsystem 11

2.1.1 Separierung von PBMC 11

2.1.2 Auftauen und Kryokonservieren von Zellen 12

2.1.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung 12

2.1.4 Aufarbeitung der Zellen für die Versuche 13

2.2 Charakteristik der DNA-schädigenden Agenzien 13

2.2.1 ^{211}At-Astatid 13

2.2.2 ^{188}Re-Perrhenat 14

2.2.3 Doxorubicin 15

2.2.4 Dosimetrie und Bestrahlungsbedingungen 16

2.2.5 Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re und Inkubation mit Doxorubicin 17

2.3 Experimenteller Teil 19

2.3.1 Komet-Assay 19

2.3.2 Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie 24

2.3.3 Annexin V-FITC/PI-Durchflusszytometrie 25

2.4 Statistik 28

2.4.1 Beschreibende Statistik 28

2.4.2 Vergleichende Statistik 29

3. Ergebnisse 31

3.1 Detektion von initialen DNA-Schäden mit dem Komet-Assay 31

3.1.1 Initiale DNA-Schäden nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re im alkalischen Komet-Assay 31

3.1.2 Initiale DNA-Schäden nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re im neutralen Komet-Assay 36

3.1.3 Effekt von Doxorubicin im alkalischen und neutralen Komet-Assay 39

3.1.4 Vergleich der Ergebnisse des alkalischen und neutralen Komet-Assays 41
3.1.5 Vergleichende Statistik im Komet-Assay 43

3.2 Reparatur der initialen DNA-Schäden nach Exposition mit ^{211}At, ^{188}Re und Doxorubicin 47
3.2.1 Reparatur im alkalischen Komet-Assay 47
3.2.2 Reparatur im neutralen Komet-Assay 52
3.2.3 Vergleichende Betrachtungen 55

3.3 Detektion von Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur mit der Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie 57
3.3.1 Messung von DSB und deren Reparatur nach Bestrahlung mit ^{211}At 57
3.3.2 Messung von DSB und deren Reparatur nach Bestrahlung mit ^{188}Re 61
3.3.3 Bestimmung von DSB und deren Reparatur nach Inkubation mit Doxorubicin 65
3.3.4 Vergleichende Betrachtungen 68

3.4 Detektion von Apoptose mit Annexin V-FITC/PI-Durchflusszytometrie 71
3.4.1 Effekt von ^{211}At auf die Apoptoserate 71
3.4.2 Effekt von ^{188}Re auf die Apoptoserate 74
3.4.3 Vergleichende Betrachtungen 76

4. Diskussion 79

4.1 Biologisches Testsystem 80

4.2 Alkalischer Komet-Assay 81
4.2.1 Effekte der DNA-schädigenden Noxen 81
4.2.2 Vergleich der DNA-schädigenden Noxen 83
4.2.3 Reparatur der Initialschäden 85

4.3 Neutraler Komet-Assay 87
4.3.1 Effekte der DNA-schädigenden Noxen 87
4.3.2 Vergleich der DNA-schädigenden Noxen 89
4.3.3 Reparatur der Initialschäden 90

4.4 Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie 93
4.4.1 Effekte nach Bestrahlung mit ^{211}At 95
4.4.2 Effekte nach Bestrahlung mit ^{188}Re 96
4.4.3 Einfluss von Doxorubicin 96
4.4.4 Vergleich der DNA-schädigenden Noxen 98

4.5 Annexin V-FITC/PI-Durchflusszytometrie 99
4.5.1 Einfluss von ^{211}At auf die Apoptoseinduktion 100

4.5.2 Einfluss von ^{188}Re auf die Apoptoseinduktion 102
4.5.3 Vergleich von ^{211}At und ^{188}Re 102
4.6 Zusammenfassende Betrachtungen und Einschätzung der biologischen Wirkung der Radionuklide 105
4.7 Limitationen 109
5. Zusammenfassung 111
6. Literaturverzeichnis 113
7. Anhang 129
7.1 Materialien 129
7.1.1 Chemikalien 129
7.1.2 Lösungen und Puffer 130
7.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien 131
Eidesstattliche Erklärung 132
Danksagung 133
Thesen 134

Verzeichnis der Abkürzungen

BER	Basenexcisionsreparatur
BP	Bindungspuffer
BSA	Bovine serum albumin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoledihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSB	Doppelstrangbruch
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurven
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
ESB	Einzelstrangbruch
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Gy	Gray, Einheit der Energiedosis
HR	homologe Rekombination
HWZ	Halbwertszeit
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
IgG	Immunglobulin G
KI	Konfidenzintervall
LET	Linearer Energietransfer
MDS	Multiple damaged sites
NHEJ	nichthomologe Endenverknüpfung (non homologous end joining)
NV	Normalverteilung
OTM/TM	Olive Tail Moment/ Tail Moment
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (periphere mononuclear blood cells)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
PP-Röhrchen	Polypropylen-Röhrchen
PS	Phosphatidylserin
RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
RT	Raumtemperatur
SCGE	Einzelzell-Gelelektrphorese (single cell gel electrophoresis)
SDS	Natriumdodecylasulfat
SLS	Natriumlaurylsulfat

1. Einleitung

1.1 Nuklearmedizinische Therapie und deren Wirkung

Während in der nuklearmedizinischen Diagnostik Gamma- und Positronenstrahler eingesetzt werden, stehen für therapeutische Vorhaben vor allem die Beta-Emitter ^{131}I, ^{188}Re, ^{186}Re und ^{90}Y zur Verfügung. Routinemäßig angewandt wird vor allem die Radioiodtherapie benigner und maligner Schilddrüsenerkrankungen mit ^{131}I-NaI, weitere Therapiemöglichkeiten sind die palliative Schmerztherapie bei Knochenmetastasen mit ^{153}Sm-EDTMP oder ^{188}Re-HEDP, die Radioimmuntherapie des CD20 positiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms mit ^{90}Y-Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin) und die myeloablative Radioimmuntherapie mit ^{188}Re-anti-CD66-Antikörpern. Die Behandlung neuroendokriner Tumoren mit Metaiodobenzylguanidin ^{131}I-MIBG und ^{90}Y-Octreotid sind weitere häufig eingesetzte Radiotherapien. In der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin Dresden liegen zudem umfangreiche Erfahrungen zur Anwendung von ^{188}Re-B20-Mikrosphären zur selektiven internen Radiotherapie (SIRT) des hepatozellulären Karzinoms (HCC) und von Lebermetastasen vor [222].

Erstmals wurden 1989 ^{211}At-Humanserumalbumin-Mikrosphären (B20) für eine Alpha-Endotherapie eingesetzt [49]. Der Einfluss von ^{211}At auf das genetische Material maligner Aszitestzellen in vivo (Ehrlich-Mäuseasziteskarzinom) wurde mit ^{211}At-markierten Mikrosphären untersucht [25].

Im Kontext mit der potentiellen Anwendung von ^{211}At-markierten Molekülen als Radiotherapeutika stellten Bloomer et al. ^{211}At-Radiokolloide her [20] und Larsen et al. [107] markierten Polymer-Partikel mit ^{211}At. Umfassende Untersuchungen zum Labeling von Antikörpern bzw. deren Fragmenten mit dem Ziel des klinischen Einsatzes des Alpha-Emitters zur Immuntherapie wurden von Zalutsky et al. [227-230] veröffentlicht. Andere Alpha–Emitter z.B. ^{213}Bi sind ebenfalls zur Immuntherapie eingesetzt worden [188]. Eine Übersicht über Therapieansätze mit Alpha-Emittern gibt der Review von Imam [88].

1.2 Biologische Effekte ionisierender Strahlung

Die Wirkung von ionisierender Strahlung auf lebendes Gewebe wird als biologische Strahlenwirkung definiert. Sie beruht auf der Übertragung von Energie auf lebende Zellen, wobei nur der absorbierte Anteil wirksam werden kann (Grotthus-Draper-Gesetz). Das Ausmaß der Zellschädigung hängt von mehreren Faktoren ab, wie z.B. der absorbierten Dosis, den strahlenphysikalischen Eigenschaften der Radionuklide, der Expositionsdauer, der Strahlenempfindlichkeit des biologischen Systems und der regionalen Energiedeposition bzw. Energiedichte der Strahlung (Linearer Energie-Transfer, LET) [43, 46, 52]. Die durch ionisierende Strahlung erzeugte Energie kann vom Desoxyribonukleinsäure-Molekül (DNA)

absorbiert werden oder Sekundäreffekte über Radikalbildung bewirken. Als Folge der physikalischen Prozesse treten eine Anzahl chemischer Veränderungen an der DNA auf (Abb. 1). Das Spektrum der Schäden reicht von chemischen Modifikationen einzelner Basen (Oxidation, Desaminierung, Alkylierung), der Erzeugung apurinischer Stellen durch Spaltung der Zucker-Basen-Bindungen, DNA-Vernetzungen (Cross-links) bis zu Einzelstrangbrüchen (ESB) und Doppelstrangbrüchen (DSB) [141, 178, 211]. Der hohe lineare Energietransfer von Alpha-Strahlern (mittlerer LET=100 keV/µm) führt im Vergleich zu Beta-Strahlern (mittlerer LET~0,2 keV/µm) zu einer verstärkten Energieabsorption. Es wird deshalb angenommen, dass Alpha-Emitter verstärkt DNA-Doppelstrangbrüche induzieren können, während ein niedriger LET (Beta- und Gamma-Strahlung) hauptsächlich Einzelstrangbrüche erzeugt. Die Doppelstrangbrüche werden als relevante Schäden für den Zelltod bzw. das Überleben angesehen, wobei eine Häufung (Cluster) der Läsionen auf einem eng begrenzten DNA-Abschnitt (<20 bp) zu so genannten Multiple Damaged Sites (MDS) führen. Enthält eine MDS zwei Einzelstrangbrüche in den komplementären Strängen in unmittelbarer Nähe zueinander, entsteht ebenfalls ein DNA-Doppelstrangbruch [53, 139, 178, 191, 192].

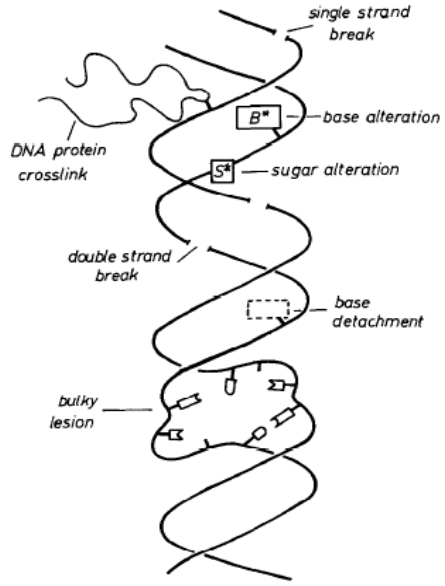

Fig. 2. Various types of DNA lesions detected in eukaryotic cells irradiated with ionizing radiation.

Abb. 1: Übersicht über die chemischen Veränderungen am DNA-Molekül durch ionisierende Strahlung aus Frankenberg-Schwager [61]

Demzufolge hängt die Häufung der DNA-Schäden auf einem Abschnitt der DNA sowohl vom Linearen Energietransfer (LET), als auch von der Chromatinstruktur der Zelle ab. Betrachtet man die Anzahl der Treffer im Zellkern pro Dosiseinheit, ergibt sich eine Abhängigkeit von

der deponierten Energie pro Weglänge des Teilchens. Bei Niedrig-LET-Strahlern (z.B. ^{188}Re) erfolgt die Strahlenwirkung zu zwei Dritteln indirekt über Radikalbildung und nur zu einem Drittel über direkte Interaktionen mit der DNA. Bei den Hoch-LET-Emittern (z.B. ^{211}At) werden die DNA-Schäden durch direkte Interaktionen und dem Targetmolekül um so wahrscheinlicher, je höher die Ionisationsdichte der Strahlung ist [73]. Ein LET von 90-100 keV/µm ist besonders wirksam, da die mittlere Distanz zwischen zwei ionisierenden Ereignissen mit ca. 2 nm dem Durchmesser der DNA-Doppelhelix entspricht. Daraus resultiert eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Entstehung eines Doppelstrangbruchs ohne „Energieverschwendung“ [73]. Da Alpha-Partikel größere intragenische Deletionen verursachen ist die Reparatur der entstehenden DSB aufwändiger als die Beseitigung der Schäden nach Exposition mit Gamma- oder Beta-Strahlung [165].

1.3 Ursachen für DNA-Schäden

Die DNA einer Zelle ermöglicht die Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels und dient gleichzeitig als Träger des Erbgutes zur Weitergabe der Erbinformationen an nachfolgende Generationen. Das Überleben einer Zelle hängt von der Integrität ihrer DNA ab, wobei nur geringe Änderungen in der DNA-Sequenz akzeptiert werden. Die Ursachen für die Schäden am DNA-Molekül sind komplex und können in endogene und exogene Schäden nach der Art ihrer Entstehung unterschieden werden [63].

Die DNA ist permanent spontanen, endogenen Ereignissen aus dem normalen Metabolismus ausgesetzt. Normale zelluläre Reparaturmechanismen können DNA-Strangbrüche (Topoisomerase II, Endonukleasen) verursachen. Weitere Beispiele für endogen entstehende DNA-Schäden sind Basenfehlpaarungen im Rahmen der Replikation [103], spontane Desaminierung von Basen sowie der Verlust ganzer Basen durch Hydrolyse (häufig als apurinische Stelle, AP-Stelle bezeichnet). Eine Hauptquelle von endogenen Schäden an den intrazellulären Makromolekülen stellen aufgrund ihrer hohen Reaktionsfähigkeit reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dar [2]. Exogene Ursachen für die Schädigung der DNA sind beispielsweise die ionisierende Strahlung (Alpha-, Beta- und Gamma-Strahlung), die Wirkung von zytotoxischen Substanzen (Alkylantien, Interkalantien) sowie die UV-Strahlung.

Durch ionisierende Strahlung verursachte exogene DNA-Schäden können wiederum in direkte und indirekte Schäden unterschieden werden [62]. Indirekte Schäden entstehen durch Absorbtion der Energie im wässrigen Anteil der Zelle, nahezu die gesamte absorbierte Energie wird durch die Radiolyse des Wassers verbraucht (99 %). Bei direkten Schäden wird die Strahlungsenergie direkt auf die DNA übertragen und führt zur Ionisierung von Basen und Kohlehydraten der DNA sowie zur Spaltung chemischer Bindungen [211]. Die auf diese Weise entstehenden Schäden können identisch sein mit denen, die auf indirektem Weg

entstehen. Neben der Verursachung von Basenschäden kann ionisierende Strahlung direkt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen, 1 Gy Gamma-Strahlung verursacht in Säugerzellen ca. 1000 Einzelstrangbrüche und 25-40 Doppelstrangbrüche [169, 211].
Zytostatisch wirksame Antbiotika (Doxorubicin) fungieren als DNA-Interkalanzien und hemmen die Nukleinsäure-Synthese durch Behinderung der Replikations- und Transkriptionsfunktion der Polymerasen. Die DNA-Strangbrüche entstehen zudem durch Hemmung der Topoisomerase II-Aktivität und durch Radikalbildung (vgl. 2.2.3).

1.4 DNA-Reparatur

DNA-Reparatur läßt sich primär als zelluläre Antwort definieren, die für die Wiederherstellung der normalen Nucleotid-Sequenz sowie der Stereochemie der DNA verantwortlich ist [22]. Zur Beseitigung der Läsionen sowie zur Rekonstitution der Integrität und Funktionalität der DNA besitzt jede Zelle Mechanismen, um die primären DNA-Modifikationen zu beseitigen und somit Mutationen zu verhindern [86].
Diese Reparaturmechanismen umfassen die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die Basenexzisionsreparatur (BER), die Reparatur von Fehlpaarungen (Missmatch-Reparatur, MMR), homologe Rekombination (HR) und nichthomologe Verknüpfung der Enden (NHEJ). DNA-Schäden, die mit NER, BER oder MMR behoben werden, betreffen nur einen der beiden DNA-Stränge und können durch Ausschneiden der geschädigten Stelle mit Endonukleasen und komplementärem Auffüllen des fehlenden Nukleotids durch DNA-Polymerasen beseitigt werden.
Die Rekonstitution von Doppelstrangbrüchen ist weitaus komplizierter, da beide DNA-Stränge betroffen sind und den Reparaturenzymen Vorlagen für die Realisierung der Reparaturvorgänge fehlen. Den Zellen mit DNA-Doppelstrangbrüchen stehen zwei Hauptreparaturwege zur Verfügung: Homologe Rekombination (HR) und nichthomologe Verknüpfung der Enden (NHEJ).
Der Doppelstrangbruch kann durch homologe Rekombination repariert werden, wenn die jeweiligen Bruchenden genügend Homologien zu einem anderen DNA-Strang aufweisen (Schwesterchromatid). Dabei wird das intakte Schwesterchromatid herangezogen, um die Bruchenden zu binden, fehlende Anteile zu resynthetisieren und das defekte Chromatid zu komplettieren [62]. Während dieses Vorgangs kommt es zu einem Austausch von DNA-Strängen zwischen den beiden beteiligten Chromosomen, so dass dieser Vorgang als Schwester-Chromatid-Austausch (sister-chromatid exchange, SCE) nachgewiesen und als Marker für stattgefundene homologe Rekombination genutzt werden kann. Dieser Weg zur DSB-Reparatur gilt als sehr effizient und kommt vor allem in der S- und G_2-Phase des Zellzyklus zum Einsatz, wenn eine Kopie der geschädigten Sequenz vorhanden ist.
Für das direkte Verbinden der Bruchstücke durch „Non-Homologous-End-Joining“ (NHEJ) ist

die Verwendung des Schwesterchromosoms nicht notwendig. Dieser wichtige Mechanismus der Wiederverknüpfung von Doppelstrangbrüchen bewirkt jedoch, dass an der Verknüpfungsstelle mehrere Basenpaare verloren gehen. In ähnlicher Weise können zwei beliebige DNA-Moleküle von verschiedenen Chromosomen zusammengefügt werden. Die Bildung solcher möglicherweise mutagenen Deletionen ist ein Beispiel dafür, wie die Reparatur von DNA Mutationen hervorrufen kann. Das NHEJ scheint der am häufigsten verwendete Reparaturweg in adulten und differenzierten Zellen zu sein und wird in der G_1-Phase des Zellzyklus eingesetzt [60].

1.5 Detektion von DNA-Schäden und Zellüberleben

Die klinische Strahlenbiologie befasst sich im Wesentlichen mit der Erforschung der Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen, dabei stehen Untersuchungen strahleninduzierter Veränderungen an der DNA im Vordergrund. Als ein wichtiger Parameter in der Strahlenbiologie gilt die funktionelle Definition des Zelltodes, die durch den Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit (klonogener oder reproduktiver Zelltod) gekennzeichnet ist. Die proliferative Kapazität von Zellen wird mit Hilfe des Koloniebildungsassays bestimmt, der bis heute Goldstandard für in vitro Untersuchungen ist [133].

Zu den zytogenetischen Effekten nach Exposition von Zellen mit ionisierender Strahlung gehören die Chromosomenabberationen, die zum Zelltod (azentrische Chromosomen, Ringbildung, interstitielle Deletion) oder über Translokationen zu Mutationen führen können. Diese chromosomalen Abberationen korrelieren invers mit dem Überleben der Zellen. Methoden zur Detektion der Chromosomenabberationen sind die klassische Chromosomenbänderungsanalyse [50] mit spezifischer Anfärbung der Chromosomenbanden in der Metaphase des Zellzyklus (Giemsa-Färbung) sowie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit Fluorochrom-markierten DNA-Sonden [116].

Mit dem Mikronukleus-Test steht eine weitere Methode zur Detektion von Chromosomenschäden zur Verfügung. Nach Durchlaufen einer Zellteilung sind die Schäden in Form von Mikronuklei detektierbar [55]. Der Test ist weniger sensitiv als die Chromosomenanalyse.

Mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Komet-Assay) können initiale DNA-Schäden, die Reparaturkapazität von Zellsystemen und die individuelle Strahlenempfindlichkeit von Zellen nach ex vivo Strahlenexposition analysiert werden. Wie bei allen zytogenetischen Untersuchungen ist eine Aussage über die funktionelle Integrität der Zelle nicht möglich [191]. Zur biologischen Dosisindikation ist die Detektion von Chromosomenabberationen besser geeignet als der Komet-Assay.

Der biologische Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden wird im folgenden Abschnitt kurz vorgestellt.

Messung von DNA-Schäden mit Einzelzell-Gelelektrophorese (SCGE, Komet-Assay)

Mit der Einzelzell-Gelelektrophorese, meist als Komet-Assay bezeichnet, können DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen (Basenschäden) sowie Quervernetzungen zwischen den DNA-Strängen (cross-links) detektiert werden. Das Testprinzip beruht auf der Messung der Migration negativ geladener DNA-Bruchstücke, die entsprechend ihrer Masse im elektrischen Feld wandern. In der alkalischen Version (Elektrophorese bei pH>12,6) ermöglicht der Komet-Assay den Nachweis von Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie alkalilabilen Stellen. Unter diesen Bedingungen denaturiert die DNA-Helix bei gleichzeitiger Auftrennung des DNA-Strangs in zwei Einzelstränge, sodass keine Unterscheidung zwischen ESB und DSB erfolgen kann [53, 139, 191, 192].
Der Komet-Assay wird von zahlreichen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Protokollen verwendet [139, 140, 143, 145]. Die Versionen der Komet-Assays variieren hinsichtlich des pH-Wertes bei Lyse und Elektrophorese (vgl. Tab. 1).

Tab. 1: Überblick über die Erstetablierung der verschiedenen Komet-Assay-Versionen mit Modifikation des pH-Wertes bei Lyse und Elektrophorese

Arbeitsgruppe	**Lyse**	**Elektrophorese**	**DNA-Schadenstyp**
Östling und Johanson (1984)	schwach alkalisch	neutral	Doppelstrangbrüche
Olive et al. (1991)	neutral	neutral schwach alkalisch	Doppelstrangbrüche
Singh et al. (1988,1994)	alkalisch	alkalisch	Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenschäden, alkalilabile Stellen

Eine Verringerung des pH-Wertes des Elektrophoresepuffers (pH 7-8) steigert die Spezifität des Tests für Doppelstrangbrüche, da die Bindungen zwischen den Einzelsträngen der DNA erhalten bleiben. Zur Detektion von Doppelstrangbrüchen eignet sich die neutrale Version des Komet-Assays [157, 219].
Sowohl mit der alkalischen als auch mit der neutralen Variante des Komet-Assays können die induzierten Initialschäden und die Reparaturkapaziät des Zellsystems untersucht werden.

Messung von DNA-Schäden mit Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM)

Die Schädigung und Reparatur der DNA findet im Kontext des Chromatins statt. In eukaryotischen Zellen ist die DNA mit Histonproteinen assoziert, die das hoch kondensierte Chromatin bilden. Das Grundelement des Chromatins ist das Nukleosom, das aus 146 DNA-Basenpaaren besteht, die 1,7-fach um einen Proteinkern (Histonoktamer) gewunden sind. Dieses Histonoktamer setzt sich aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 zusammen. Jedes Nukleosom wird durch so genannte Verbindungs-DNA („linker-DNA“, die mit einem Verbindungshiston „linker-Histon“ komplexiert ist) mit dem nächsten Nukleosom verknüpft. Diese Stufe der DNA-Packung im Kern wurde von Foster et al. [60] als Perlenkette beschrieben. Kovalente Veränderungen an den Histonen z.B. Acetylierung, Deacetylierung, Phosphorylierung verändern lokal die Chromatinstruktur und tragen so zur Erleichterung des Funktionierens der Replikations-, Transkriptions- und Reparaturproteine bei. Ein Beispiel für kovalente Veränderungen stellt die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 in der Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. Entsteht ein Doppelstrangbruch, so werden innerhalb einiger Minuten H2AX-Proteine zu phospho-H2AX (auch γ-H2AX) phosphoryliert [164, 173, 176]. Die Phosphorylierung wird in der unmittelbaren Umgebung des Bruchs initiiert, breitet sich radial aus, sodass schließlich H2AX-Moleküle bis zu einigen Megabasen vom Strangbruch entfernt betroffen sind [172]. Die als nukleäre Foci nachweisbaren Komplexe, setzen sich aus γ-H2AX, Reparaturenzymen und Proteinen zusammen, die den Zellzyklus als Checkpointproteine regulieren. Dabei scheint γ-H2AX die Funktion eines Ankers zu haben, der für die Rekrutierung und korrekte sterische Anordnung der Reparaturkomplexe in der Umgebung des Schadens notwendig ist. Andererseits vermittelt γ-H2AX über die Checkpointproteine das Signal zur Reparatur potentiell letaler Läsionen. Als eine weitere Funktion wird von Fernandez-Capitello et al. [56] die Fixierung der beiden Bruchenden und die Lenkung der DNA-Reparatur in Richtung der fehlerfreien homologen Rekombination beschrieben.

Zelltod durch Apoptose und Nekrose

Ist eine vorliegende DNA-Schädigung so ausgedehnt, dass die Mechanismen der DNA-Reparatur nicht greifen können, wird in der Zelle der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet. Es handelt sich hierbei um einen komplex regulierten Vorgang, der für den Erhalt der genomischen Stabilität der Zelle und die Prävention der Tumorentstehung unabdingbar ist [98, 225]. Zahlreiche interne und externe Faktoren können das Apoptoseprogramm auslösen [190, 232]. Zwei Mechanismen zur Induktion von Apoptose gelten aus biochemischer Sicht als gesichert, der Todesrezeptorweg (death receptor pathway) und der

mitochondriale Weg, die jeweils in die Aktivierung von Caspasen münden. Spezifisch für den Todesrezeptorweg (extrinsisch) ist die Bindung von Liganden an Rezeptoren der Zellmembran, deren Aggregation sowie die Bildung des so genannten Death Inducing Signalling Complexes (DISC). Dieser aktiviert über den Adapter FADD (Fas-associated death domain protein) die Caspasen 8 und 3 [83]. Der mitochondriale Weg (intrinsisch) wird hauptsächlich durch intrazelluläre Stimuli wie DNA-Schäden ausgelöst, wobei das Tumorsupressorgen p53 eine zentrale Rolle spielt. Über die Aktivierung von Proteinen (bcl2/BAX), die eine Affinität zur Mitochondrienmembran besitzen, wird die Freisetzung von Cytochrom C bewirkt. Die Bildung eines Komplexes aus Cytochrom C, Apaf-1 und Caspase 9 endet in der Aktivierung von Caspase 3, dem gemeisamen Produkt beider Apoptosewege [26].

Während die Apoptose einem genetisch gesteuerten Programm unterliegt, ist die Nekrose meist ein pathologischer Prozess, der zur Zerstörung der Zellmembran, zum Ausfall der metabolischen Aktivität bis zum kompletten Zellzerfall führt. Die nekrotischen Vorgänge können unter Energiemangel ablaufen, dies deutet darauf hin, dass die Zelle bei massiven chemischen oder physikalischen Einwirkungen die energiesparende Variante des Zelltodes wählt. Inzwischen ist bekannt, dass die Todesart, über die geschädigte Zellen absterben, von vielen Faktoren abhängt, z.B. dem Energiezustand der Zelle, den verfügbaren Wachstums- und Überlebensfaktoren oder der Funktionsfähigkeit der Organellen [137].

Eine Möglichkeit zur Detektion apoptotischer Zellen ist die durchflusszytometrische Messung fluorochrommarkierter Antikörper (Annexin V-FITC, vgl. 2.3.3), die in Abhängigkeit von der Integrität der Zellmembran in die Zelle diffundieren.

1.6 Ziele der Arbeit

Ionisierende Strahlung verursacht DNA-Schäden, die mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die biologische Wirksamkeit von drei DNA-schädigenden Noxen zu erfassen und diese hinsichtlich ihrer Wirkung sowie ihrer Reparatureffizienz zu vergleichen. Es werden zwei unterschiedliche Strahlenqualitäten (Alpha-Emitter und Beta-Emitter) angewendet, die eine unterschiedliche regionale Energiedeposition der Strahlung (LET) aufweisen. Zum Vergleich wird das Zytostatikum Doxorubicin gewählt, das DNA-Schäden über andere biochemische Mechanismen verursacht (nichtkovalente Bindung an die DNA).

Die methodische Zielstellung ist, sowohl direkte Schäden an der DNA als auch sekundäre Veränderungen infolge der DNA-Schädigung mit dem alkalischen und neutralen Komet-Assay, der Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie sowie durch Apoptosedetektion mit der Annexin V/PI-Durchflusszytometrie nachzuweisen. In Abhängigkeit von der Qualitiät der Schädigung (ESB, DSB) erfolgt die Reparatur mit unterschiedlicher Kinetik und Effizienz. Die drei DNA-schädigenden Noxen werden hinsichtlich der Residualschäden verglichen.

Als biologisches Testsystem sind periphere, mononukleäre Blutzellen geeignet, die in vivo und in vitro als eine strahlensensible Zellart zur Detektion von DNA-Schäden gelten.

Während für die biologischen Effekte nach externer Bestrahlung umfangreiche Studien vorliegen, gibt es über das DNA-Schädigungspotential von offenen Radionukliden kaum systematische, vergleichende Untersuchungen. Es soll deshalb geprüft werden, ob mit den gewählten Methoden zellschädigende Einflüsse eines Alpha-Strahlers und eines Beta-Strahlers in vitro detektiert werden können und diese sich in einer Dosis-Wirkungs-Beziehung quantitativ erfassen lassen.

Für die klinische Anwendbarkeit ist die Sensitivität der Teste von Bedeutung. Wichtig ist ihre Anwendbarkeit zur Detektion von DNA-Schäden nach in vivo Applikation von Radiotracern in physiologisch relevanten Dosisbereichen. Die Bestimmung der individuellen Strahlensensibilität und Reparaturkapazität in vitro an peripheren Lymphozyten vor Beginn einer externen oder internen Radiotherapie könnte in Zukunft eine Rolle für eine individuelle Therapieplanung in der Nuklearmedizin spielen. Darüber hinaus muss der Effekt einer Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Immun- oder Chemotherapie erfassbar sein. Deshalb wird als ein weiterer Aspekt der Arbeit das DNA-schädigende Potential von Doxorubicin mit den DSB-detektierenden Methoden neutraler Komet-Assay und Gamma-H2AX-Immunfluoreszenz bestimmt.

Somit ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Kann die unterschiedliche Wirksamkeit von Alpha- und Beta-Strahlung sowie des Zytostatikums Doxorubicin mit der Art des Schadens (Einzel- oder Doppelstrangbruch) korreliert werden?
- Gibt es Unterschiede in der Reparaturkinetik nach Exposition mit den schädigenden Agenzien und werden die initialen Schäden in Abhängigkeit von der Qualität der DNA-Schäden repariert?
- Kommen unterschiedliche Methoden zu qualitativ und quantitativ ähnlichen Ergebnissen?
- Welche Aussage kann zur biologischen Wirksamkeit des Alphastrahlers im Vergleich zum Beta-Strahler anhand der eigenen Daten formuliert werden?

Zur Beantwortung dieser Fragen ergeben sich folgende Arbeitsaufgaben:

- Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen für den Alpha-Emitter ^{211}At, für den Beta-Emitter ^{188}Re, sowie für das Zytostatikum Doxorubicin
- Quantifizierung der Initialschäden (Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche) sowie die Darstellung der Reparaturkinetik
- Einführung der neutralen Variante des Komet-Assay zur Unterscheidung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen einschließlich der Quantifizierung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen für ^{211}At, ^{188}Re und Doxorubicin mit dem Komet-Assay
- Etablierung der Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen
- Analyse der Apoptoserate mit Annexin V-FITC/PI zur Erfassung des Zellüberlebens
- Bewertung von Sensitivität und Spezifität der biologischen Methoden und Schlussfolgerungen hinsichtlich klinischer Fragestellungen in der nuklearmedizinischen Therapie

2. Material und Methode

2.1 Biologisches Testsystem

Alle Versuche wurden mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durchgeführt. Dazu wurden als Ausgangsmaterial für die Experimente entweder Vollblutproben oder so genannte Buffy coats verwendet, ein Produkt aus Blutspenden, das noch Thrombozyten und Leukozyten sowie einen geringen Anteil Erythrozyten enthält. Die Buffy coats wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinkums Dresden von gesunden, anonymen Eigenblutspendern nach deren Einverständniserklärung bezogen. Da der Anteil der Lymphozyten im Pool der mononukleären Blutzellen 75 %-85 % beträgt, wird im weiteren Verlauf der Arbeit die Bezeichnung PBMC und Lymphozyten synonym verwendet.

2.1.1 Separierung von PBMC

Die Isolierung der mononukleären Zellen aus Heparin-Vollblutproben bzw. Buffy coats erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation nach dem Standardverfahren [202].
Aufgrund des unterschiedlichen spezifischen Gewichts von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten erhält man nach der Zentrifugation vier Phasen: In der obersten Schicht das Plasma, in der zweiten die Interphase mit den mononukleären Zellen, in der dritten Schicht das Ficoll-Trennmedium und in der vierten Schicht die Granulozyten und Erythrozyten.
Durchführung

- Buffy-coat oder Li-Heparin Blut 1:1 mit 1x PBS verdünnen
- 15 ml Ficoll mit maximal 25 ml Blut/PBS überschichten (50 ml Falconröhrchen)
- 30 min bei 500 g ohne Bremse bei Raumtemperatur (RT) zentrifugieren
- PBMC (weißer Ring) in neues Falconröhrchen pipettieren, mit PBS auffüllen
- Zentrifugation bei 360 g, 10-12 min bei RT mit Bremse
- Pellet mit 1 ml PBS resuspendieren und erneut waschen,
- Zentrifugation bei 360 g, 10 min bei RT mit Bremse
- Pellet in 10 ml RPMI+20 % FKS aufnehmen
- Zellzählung (1:10^3 oder 1:10^4 verdünnen)
- Einfrieren nicht für den Versuch benötigter Zellen (vgl. 2.1.2)

2.1.2 Auftauen und Kryokonservieren von Zellen

Die kryokonservierten mononukleären Blutzellen wurden nach folgendem Schema aufgetaut sowie die Zellzahl und Vitalität bestimmt.

Auftauen

- Wasserbad auf 37 °C vorwärmen
- Zellen im Wasserbad auftauen bis gerade letztes Eis verschwindet
- Röhrchen mit Alkohol 70 % absprühen und unter Sterilbank bringen
- Überführen in 50 ml Falcon-Röhrchen und zunächst tropfweise (osmotischer Schock) frisches Kulturmedium zugeben
- Zentrifugation 4 min bei max. 280 g
- Medium absaugen und in neuem Zellkulturmedium resuspendieren

Kroykonservieren

Zur Kryokonservierung der mononukleären Zellen wurde mit Kulturmedium RPMI 1640 unter Zusatz von 25 % FKS und 20 % DMSO in folgender Weise gearbeitet.

- 0,5-1,0 ml Lymphozyten in Normalmedium bis 20 Mio/vial mit Kryomedium im Verhältnis 1:1 gut durchmischen
- sofort auf Eis oder in Nalgene-Box (vorgekühlt) 24 h bei -80 °C dann in flüssigen Stickstoff (-197 °C).

2.1.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Nach dem Auftauen der Zellen bzw. der Isolierung der PBMC schloss sich die Zellzählung mit einem Partikelzellgerät Modell TT (CASY) oder dem Hämacytometer (Zählkammer nach Neubauer) an.

Zählung mit dem Zellcounter

Die separierten PBMC wurden nach folgender Vorschrift weiterverarbeitet:

- Vorverdünnung von 1:5000: 2 µl aus dem Zellpellet in 10 ml CASYTON Lösung
- Verdünnung 1:10000: 5 ml aus Vorverdünnung und 5 ml CASYTON Lösung
- Gesamtzellzahl und Anzahl vitaler Zellen ablesen

Zählung mit dem Hämacytometer (Neubauer Zählkammer)

- Zellkonzentration auf 10^5 -10^6/ml einstellen
- 200 µl (ggf. mit PBS verdünnt) Zellsuspension mit 150 µl Trypanblau mischen
- Auftragen der Zellen auf Zählkammer und mindestens 4 Großquadrate auszählen, vitale Zellen → keine Färbung, tote Zellen → Blaufärbung
- Berechnung der Zellzahl/ml (Mittelwert gezählte Zellen x10^4 x Verdünnungsfaktor)
- Vitalität [%] = [ungefärbte Zellen/ (ungefärbte + gefärbte Zellen)] x100

2.1.4 Aufarbeitung der Zellen für die Versuche

Unmittelbar an das Auftauen oder die Isolierung der PBMC schloss sich die Zellzählung mit dem Zellcounter oder dem Hämacytometer an (vgl. 2.1.3). Die Vitalität der für die Versuche verwendeten Zellen betrug mindestens 95 %. Die Zellkonzentration lag bei 2-5x10^6 Zellen/ml Zellkulturmedium (RPMI 1640) in 1-4 ml Gesamtvolumen. Pro Versuchstag wurden Lymphozyten eines Spenders verwendet.

2.2 Charakteristik der DNA-schädigenden Agenzien

2.2.1 ^{211}At-Astatid

Für die Bestrahlungsversuche wurde als Alpha-Emitter das Nuklid ^{211}At-Astatid gewählt, im Weiteren als ^{211}At bezeichnet.

Astat ist als Element der Gruppe VIIb im Periodensystem ein Halogen und zeigt chemische Ähnlichkeit mit dem benachbarten Iod, besitzt jedoch einen stärker ausgeprägten Metallcharakter als Iod. Es sind fünf Oxidationszustände bekannt: At^-, At^0, At^+, AtO_3^-, und AtO_4^-.

Physiologisch verhält sich Astat ähnlich dem Iod und wird in Schilddrüsenzellen angereichert, eine Organifizierung in den Thyreozyten wie beim Iod findet nicht statt.

Drei Astatnuklide entstehen infolge natürlichen Zerfalles der Uranium- und Actinium-Reihe (^{215}At, ^{218}At und ^{219}At), ^{211}At gehört nicht zu den natürlichen Nukliden. Da Astat keine stabilen Isotope hat, ist es praktisch immer trägerfrei.

^{211}At wurde erstmals 1940 durch Bestrahlung von metallischem ^{209}Bi mit Alphateilchen am Zyklotron der Berkely University of California (California, USA) künstlich hergestellt.

Der radioaktive Zerfall von ^{211}At ist gekennzeichnet durch α-Emission (41,9 %; $E_{max\alpha}$=5,9 MeV) zu ^{207}Bi sowie durch Elektroneneinfang zu ^{211}Po (58,1 %). Dieses wiederum geht durch α-Zerfall (100 %; $E_{max\alpha}$=7,45 MeV) in stabiles ^{207}Pb über [19]. Der Elektroneneinfang wird durch eine γ-Komponente begleitet (charakteristische Röntgenstrahlung). Die für Dosis-Kalkulationen relevanten Beiträge sind die α-Anteile (vgl. Abb. 2). Die Halbwertszeit (HWZ) von ^{211}At beträgt 7,2 Stunden, der mittlere lineare Energietransfer 97 keV/µm, die mittlere Energie der Teilchen 6,8 MeV und die mittlere Reichweite im Gewebe 55-70 µm, Zalutsky [229].

Das Radionuklid Astat-211 wurde von der MH Hannover (MHH), Klinik für Nuklearmedizin, Bereich Radiochemie/Zyklotron bezogen. Dies ist derzeit die einzige Produktionsstätte für ^{211}At in Deutschland. Die ^{211}At-Produktion erfolgte am Zyklotron der MHH über die Reaktion ^{209}Bi(alpha,2n)^{211}At und wurde vom Target durch Trockendestillation separiert. Die chemische Form ist Astatid $[At]^-$ in 0,1 M Natriumsulfitlösung (Na_2SO_3). Geliefert wurden 50-70 MBq ^{211}At in 900 µl 0,1 M Natriumsulfitlösung mit der Radioaktivitätskonzentration 55-78 MBq/ml.

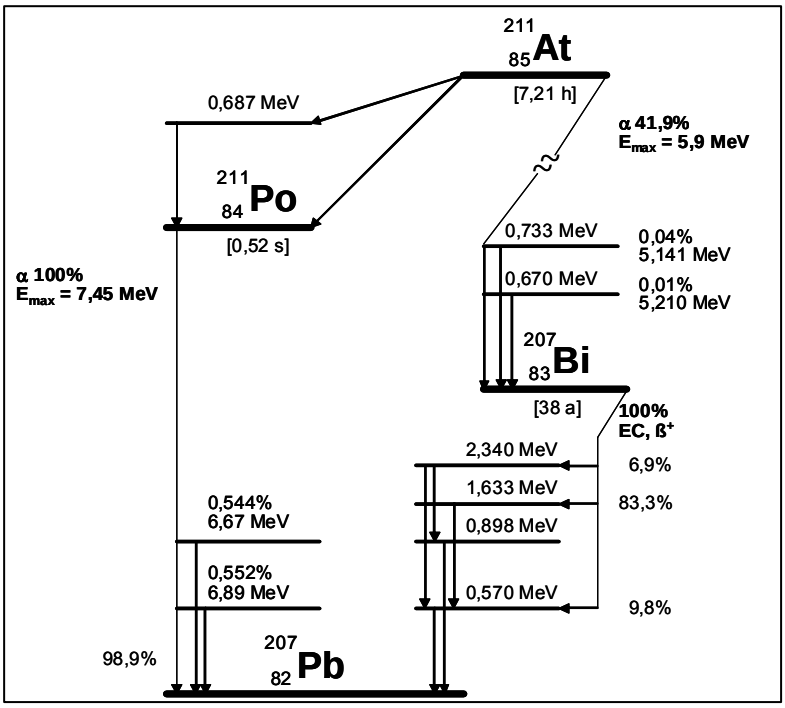

Abb. 2: Vereinfachtes Schema des radioaktiven Zerfalls von ^{211}At nach Jardine [91]

2.2.2 ^{188}Re-Perrhenat

Rhenium ist ein Übergangsmetall der 7. Nebengruppe (Mangangruppe) des PSE und hat ähnliche chemische Eigenschaften wie Mangan und Technetium. Rhenium kann in den Oxidationsstufen von –III bis +VII vorkommen, in wässriger Lösung liegt am häufigsten Perrhenat (ReO_4^-) oder Rhenat (ReO_4^{2-}) vor.

Künstliche Isotope sind ^{186}Re und ^{188}Re, die als Perrhenate, Sulfide oder an Phosphonate bzw. Biomoleküle (Proteine) gekoppelt, als radioaktive Arzneimittel Anwendung in der nuklearmedizinischen Therapie finden.

Rhenium-188 zerfällt zu 84,2 % unter Emission von Beta-Strahlung in stabiles ^{188}Os, zu 15,8 % entstehen Gamma-Quanten (155 keV). Die Gamma-Linie kann für die nuklear-medizinische Bildgebung und Dosiskalkulation genutzt werden.

Die mittlere Beta-Energie von ^{188}Re beträgt 0,76 MeV, die maximale Beta-Energie 2,12 MeV. Weitere strahlenphysikalische Eigenschaften von ^{188}Re sind die HWZ von 16,9 h, die maximale Reichweite von 10 mm, die mittlere Reichweite im Gewebe von 3,1 mm und der mittlere lineare Energietransfer von 0,19 keV/µm.

Durch Elution eines ^{188}W/^{188}Re-Generators mit 10-20 ml 0,9%iger Kochsalzlösung wird ^{188}Re chemisch als [^{188}Re]ReO_4^- trägerfrei gewonnen. Aus ^{188}W (HWZ 69,4 d) entsteht durch Beta-emission permanent ^{188}Re (radiochemisches Gleichgewicht). Die [^{188}Re]ReO_4^--Lösung kann

über Ionenaustauschersäulen auf ein kleineres Volumen konzentriert werden. ^{188}Re-Perrhenat (im Folgenden: ^{188}Re) wurde durch Elution eines ^{188}W/^{188}Re-Generators der Firma POLATOM (Swierk, Polen) in der Klinik für Nuklearmedizin Dresden hergestellt.

2.2.3 Doxorubicin

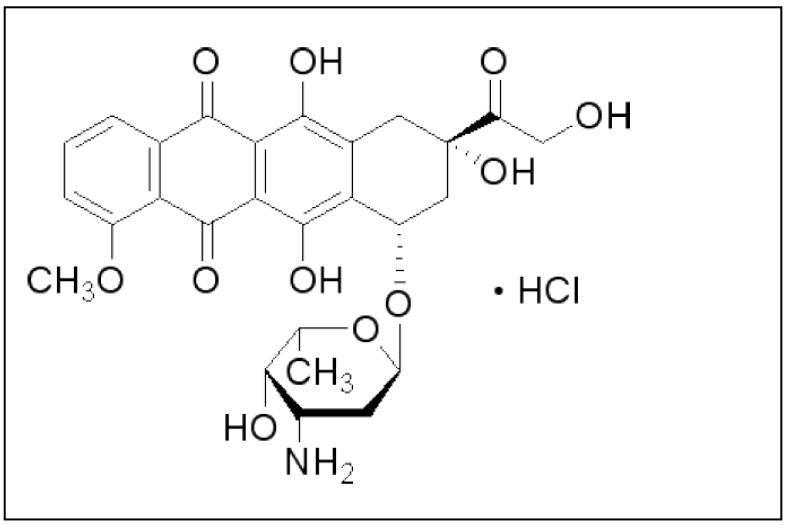

Abb. 3: Strukturformel von Doxorubicin-Hydrochlorid M_m=579,98 gmol^{-1}

Doxorubicin, auch als Adriamycin bekannt, gehört wie Daunorubicin und Epirubicin zu den zytostatisch wirksamen Antbiotika, den Anthrazyklinen (vgl. Abb. 3). Zytostatika stören die Stoffwechselvorgänge, die im Zusammenhang mit Zellwachstum oder Zellteilung stehen. Der Wirkmechanismus wird über die Hemmung des Enzyms Topoisomerase II, in dessen Folge Doppelstrangbrüche beim Supercoiling der DNA auftreten, sowie über die Interkalation des Doxorubicin-Moleküls in die DNA erklärt. Durch die interkalierenden Eigenschaften des Doxorubicins (nichtkovalente Bindung an die DNA) wird die Replikations- und Transkriptionsfunktion der Polymerasen behindert [29, 96]. Bekannt ist ebenfalls die Auslösung der Radikalbildung durch Doxorubicin [42]. Dabei werden zwei Mechanismen diskutiert:

(1) Die Reduktion von Doxorubicin zum Doxorubicin-Semichinonradikal erfolgt durch elektronen-übertragende Reduktasen.

(2) Doxorubicin agiert als Chelator von Metallionen wie Fe^{3+} oder Cu^{2+}. In einer Redoxreaktion überträgt es ein Elektron auf diese Metallionen und wird dabei oxidiert. Das entstehende Fe^{2+} oder Cu^{+} kann dann in der Fenton-Reaktion mit dem gut diffusiblen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagieren (auch O_2^- und das reduzierte Doxorubicin-Radikal) und die toxischen Hydroxyl-Radikale bilden.

In wässriger Lösung emittiert Doxorubicin im Wellenlängenbereich von λ=559-593 nm bei Anregung mit Licht der Wellenlänge λ=479 nm (Absorptionsmaximum).

2.2.4 Dosimetrie und Bestrahlungsbedingungen

Für die dosimetrischen Berechnungen stand die Olinda-Software [194] zur Verfügung. Die Anwendung dieses Modells setzt eine homogene Radioaktivitätsverteilung im Zielvolumen voraus. Die Dosisberechnung erfolgte über S-Werte (mittlere absorbierte Dosis pro Zerfall), dem Gesamtvolumen der Zellsuspension und der Bestrahlungszeit. Die S-Werte repräsentieren die strahlenphysikalischen Eigenschaften des betrachteten Nuklids. Pro Zerfall wird mit ^{211}At eine wesentlich höhere Energiedosis deponiert als mit ^{188}Re. Deshalb muss zum Erreichen einer bestimmten Dosis in gleicher Bestrahlungszeit mit unterschiedlichen Radioaktivitäten gearbeitet werden.

Definitionen

Die Energiedosis ist als absorbierte Energie pro Masseeinheit definiert. Die SI-Einheit der Energiedosis ist Gray mit 1 Gy=1 J/kg.

$$D = \frac{\Delta E_{abs}}{\Delta m}$$

Die biologische Wirkung einer Strahlung hängt von deren physikalischen Eigenschaften (LET), der Dosisleistung aber auch vom bestrahlten Gewebe und dem biologischen Endpunkt ab.

Das Verhältnis der Energiedosis einer beliebigen Strahlung (D_x) mit derjenigen einer Referenzstrahlung (D_R), die für einen bestimmten biologischen Effekt nötig ist, wird als relative biologische Wirksamkeit (RBW) definiert.

$$RBW = \frac{D_R}{D_X}$$

Als Referenzstrahlung dienen üblicherweise 250 keV Röntgenstrahlung oder ^{60}Co-Gammastrahlung.

Da für die Vergleiche der biologischen Effekte von ^{211}At und ^{188}Re keine Versuche mit einer Referenzstrahlung durchgeführt wurden, kann der Begriff der RBW nicht angewendet werden. Die biologische Wirkung wurde alternativ als Verhältnis der Effekte (z.B. OTM) bei gleicher Energiedosis berechnet bzw. die für die gleiche Wirkung erforderlichen Energiedosen in Relation zueinander gesetzt.

2.2.5 Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re und Inkubation mit Doxorubicin

^{211}At und ^{188}Re

Die Aufarbeitung der Lymphozyten vor Versuchsbeginn wurde entsprechend des Protokolls im Abschnitt 2.1.4 durchgeführt.

Die Bestrahlungen erfolgten in Gesamtvolumina von 2 ml [^{211}At]At^- oder 4 ml [^{188}Re]ReO_4^- Zellsuspension mit 2-5x10^6 Zellen/ml Kulturmedium (RPMI 1640 mit 20 % FKS). Die Bestrahlungen mit ^{211}At wurden in einem kleineren Volumen als die Versuche mit ^{188}Re durchgeführt, um das begrenzt verfügbare ^{211}At optimal einzusetzen. Die Volumina der Lösungen mit ^{211}At und ^{188}Re wurden auf 50-100 µl eingestellt und zu den Gesamtvolumina der Lymphozytensuspensionen ergänzt.

Als Bestrahlungsgefäße dienten 14 ml-Polypropylen-Röhrchen (PP) mit 16 mm Durchmesser. Alle Versuche zur Bestimmung der Radiotoxizität erfolgten auf einem Schüttler (Multi Reax, Heidolph), um die Sedimentation der Lymphozyten auf den Röhrchenboden zu verhindern. Da die Dosisberechnung auf der Annahme eines homogenen Zielvolumens beruhte, war die Bewegung der Zellsuspension notwendig. In Vorversuchen wurde die optimale Schüttelfrequenz mit unbestrahlten Zellen getestet, um eine mechanische Zellschädigung zu vermeiden. Zudem wurden Zellen ohne Bestrahlung bis zu 10 Stunden den physikalischen Versuchsbedingungen (4 °C) ausgesetzt und eine DNA-Schädigung ausgeschlossen.

Zum Erreichen der Zieldosis in einer definierten Zeit wurden die in Tabelle 2 dargestellten Radioaktivitätskonzentrationen eingesetzt. Zu beachten ist, dass die Bestrahlung für alle Experimente mit dem Komet-Assay auf konstanten Radioaktivitätskonzentrationen beruhte (1 PP-Röhrchen, alkalisch+1 PP-Röhrchen, neutral) und die Dosis über die Entnahmezeiten eingestellt wurde, indem man nach 30 min, 60 min, 120 min, 180 min sowie 240 min jeweils ein Aliquot (100 µl oder 200 µl) der Zellsuspension entnahm. Die Kontrollzellen wurden vor Zugabe der Radionuklide entnommen.

Im Unterschied dazu basieren die Versuche der γ–H2AX-Immunfluoreszenz und der Annexin V/PI-Apoptosedetektion auf dem Einsatz unterschiedlicher Radioaktivitätskonzentrationen (je 1 PP-Röhrchen pro Dosispunkt und Kontrolle) über eine konstante Zeit. Dies war notwendig, um einen gleichzeitigen Beginn der weiteren Arbeitsschritte (fixieren, färben) zu ermöglichen.

Zur Ermittlung der initialen DNA-Schäden wurden die Lymphozyten bei allen Experimenten auf Eis bestrahlt, alle Untersuchungen zur Reparturkinetik geschahen bei 37 °C in einem Brutschrank mit 5 % CO_2, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Tab. 2: Dosisbereiche und Bestrahlungszeiten für die Nuklide ^{211}At und ^{188}Re in Abhängigkeit von der biologischen Methode

Methode	**Inkubations-zeit t [h]**	**Astat-211**		**Rhenium-188**	
		Radioaktivität [MBq/ml]	**Dosis [Gy]**	**Radioaktivität [MBq/ml]**	**Dosis [Gy]**
Alkalischer Komet-Assay	0-4	1,1	0-15	7,0	0-10
Neutraler Komet-Assay	0-3	11	0-110	105	0-110
γ-H2AX-IFM	2	0,007 - 0,14	0,05-1,0	0,07 -7,0	0,5 - 5
Annexin-V/PI (FACS)	2	0 – 1,4	0 - 10	0 – 27,5	0 - 20

Nach jeder Bestrahlung wurden die Zellen durch zweimaliges Spülen mit kaltem PBS radioaktivitätsfrei gewaschen, 4 min mit 280 g zentrifugiert und anschließend entsprechend der jeweiligen Methode weiterverarbeitet. Die Proben wurden stets bis zum Auftragen auf die Objektträger auf Eis gelagert, um Reparaturprozesse zu vermeiden.

Doxorubicin

Die Experimente zur Inkubation der Lymphozyten ($2x10^6$ Zellen/ml) mit Doxorubicin wurden in 25 cm^2-Zellkulturflaschen in Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 20 % FKS über 3 h bei 37 °C im Brutschrank angesetzt. Als Kontrolle dienten Lymphozyten in einer separaten Zellkulturflasche ohne Doxorubicin. In Analogie zu den Versuchen mit den Radionukliden folgten im Anschluss an die Inkubation für die Gesamtzellsuspension in den Kulturflaschen zwei Waschschritte bei 4 °C. Im Anschluss daran wurde die Zellkonzentration auf $2\text{-}4x10^4$ Zellen/10 µl eingestellt. Die weitere Bearbeitung der Proben umfasste das Präparieren der Objektträger sowie die Durchführung der Reparaturversuche analog der für die Radionuklide beschriebenen Vorgehensweise.

2.3 Experimenteller Teil

2.3.1 Komet-Assay

Das Ziel war sowohl mit ^{211}At als auch mit ^{188}Re nach 4 h beim alkalischen Komet-Assay eine Dosis von 10 Gy zu deponieren, beim neutralen Komet-Assay 150 Gy. Für die Versuche mit ^{211}At konnte dies nicht bei jeder Lieferung realisiert werden, da die Verfügbarkeit des ^{211}At aus technischen und logistischen Gründen limitiert ist (Alleinherstellung MH Hannover, Transportdauer, physikalische Halbwertszeit von ^{211}At). Deshalb wurde übereinstimmend für beide Radionuklide eine Dosis von 110 Gy verwendet.

Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK)

Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden pro Dosispunkt die bestrahlten und radioaktivitätsfrei gespülten Zellen (vgl. 2.2.5) auf die vorbereiteten Objektträger für den alkalischen und neutralen Assay aufgetragen. Um die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für Doxorubicin zu erstellen, wurden analog die nach den Waschschritten (vgl. 2.2.5) erhaltenen Zellsuspensionen verwendet. Für jeden Konzentrationspunkt wurde ein Objektträger für den alkalischen und den neutralen Assay präpariert.

Reparatur

Die restliche Zellsuspension der für die Reparaturversuche ausgewählten Dosispunkte oder Konzentrationen wurde jeweils zur Untersuchung des Reparaturverhaltens in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (ERG) mit frischem Kulturmedium aufgenommen und bei 37 °C entsprechend den Reparaturzeiten im Brutschrank inkubiert. Nach 15 min bis 4 h bzw. maximal 20 h erfolgten die Probeentnahmen und die Präparation der Objektträger.

2.3.1.1 Alkalischer Komet-Assay

Die Variante des Komet-Assays unter stark alkalischen Bedingungen wurde entsprechend einer Modifikation nach Speit et al. [193] durchgeführt.

Auf die Objektträger wurde mindestens einen Tag vor Versuchsbeginn eine basale Agarose-schicht aufgebracht (bei 60 °C; 1,5 % NEOO in PBS) und diese horizontal auf einem Nivelliertisch getrocknet.

Pro Dosispunkt wurden 10 µl der Zellsuspension (2-4x10^4 Zellen) in 120 µl Agarose (0,5 % sea Plaque GTG Agarose in PBS, 37 °C) aufgenommen und auf die Agarosegrundschicht eines Objektträgers pipettiert. Nach Auflegen eines Deckglases und Aushärten im Kühlschrank (5 min) erhielt man eine gleichmäßige Agaroseschicht und das Deckglas konnte entfernt werden. Einen Überblick über den Ablauf des Komet-Protokolls gibt die untenstehende Abbildung (Abb. 4).

Lyse, Denaturierung und Elektrophorese

Die Präparate wurden lichtgeschützt in Lyselösung pH 10, bei 4 °C mindestens 1 h, maximal 3 Tage im Kühlschrank aufbewahrt (Entfernung von Zellmembran und Proteinen).

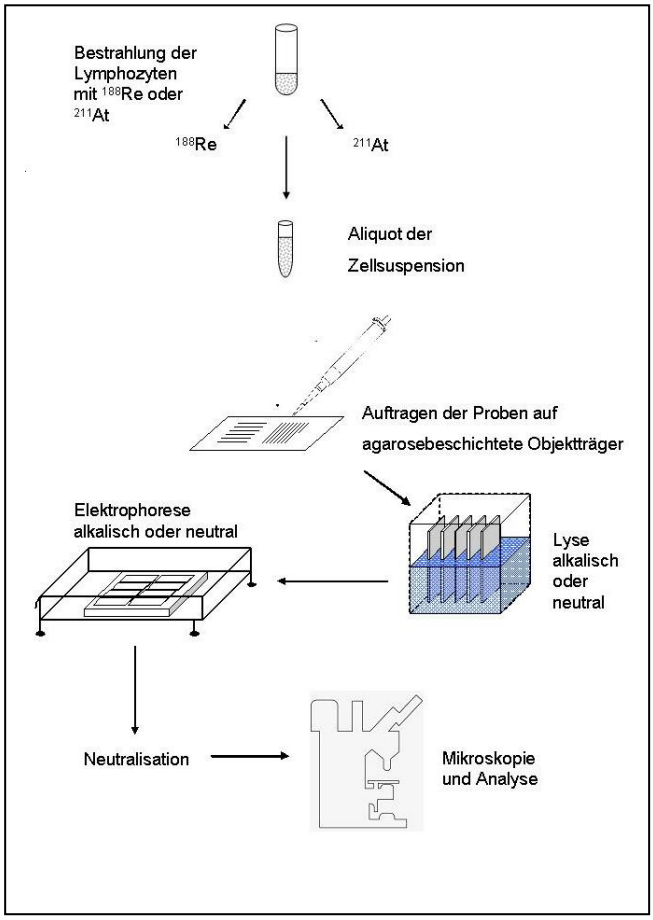

Abb. 4: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte im Komet-Assay-Protokoll (mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach Dr. C. Kahmann)

Die Denaturierung der DNA und die elektrophoretische Auftrennung von ungeschädigter DNA und DNA-Bruchstücken erfolgten in einer im Eisbad stehenden, horizontal ausgerichteten Elektrophoresekammer. Die Objektträger wurden mit Elektrophoresepuffer pH≥13, T=4 °C überschichtet und 20 min lichtgeschützt inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur Entwindung der DNA-Doppelhelix sowie zur Umwandlung der alkalisensiblen Stellen in Einzelstrangbrüche. Die Auftrennung der Bruchstücke wurde durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Spannung von 0,8 V/cm (25 V) und einer Stromstärke von maximal 300 mA gestartet. Die Elektrophoresedauer wurde so festgelegt, dass die unbestrahlten Zellen keine oder nur eine minimale DNA-Migration zeigten und die Zellkerne mit geschädigter DNA eine optimale Auftrennung von ungeschädigtem Kern und migrierter DNA in Form eines Schweifes erkennen ließen. Für Lymphozyten betrug die optimale Elektrophoresezeit 40 min.

Neutralisation und Färben

Die Neutralisation erfolgte durch Spülen der Objektträger mit Neutralisationspuffer 3x5 min und mit destilliertem Wasser 1x5 min. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger in einer Aufbewahrungsbox bis zur Auswertung gelagert.

Mikroskopie und Auswertung

Kurz vor der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurden die Objektträger mit 50 µl Ethidiumbromid (20 µg/ml) angefärbt. Der für den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid verwendete Filtersatz ist für Wellenlängen von λ=515-560 nm (Anregung, grün) geeignet, die Emissionswellenlänge beträgt λ=590 nm (Emission, gelb-orange). Die Übertragung der Abbildungen der Einzelzellen auf den PC-Bildschirm wurde mit einer CCD-Kamera realisiert. Die Auswertung erfolgte mit einer speziellen Software (Komet 6.0 GLP, Fa. Kinetic Imaging, UK). Die Analyse der Zellen wurde mit einem Objektiv 20x so durchgeführt, dass durch Mäandern die Gesamtfläche des Objektträgers abgesucht wurde und 50-100 Zellen in die Auswertung einbezogen wurden. Zellen aus den Randbereichen und morphologisch apoptotische Zellen wurden ausgeschlossen, zudem wurden nur geometrisch runde Zellkerne berücksichtigt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der Parameter Tail-Moment nach Olive (TM, OTM) [145] herangezogen. Das Tail-Moment wird berechnet aus dem Produkt von relativer Fluoreszenzintensität der DNA-Bruchstücke (Kometenschweif) in Bezug auf den Zellkern (Kometenkopf) und der auf die Zellkernmitte relativierten Wanderungsstrecke des Schweifes. Die Software ermöglicht eine Auswahl weiterer Parameter zur Darstellung des DNA-Schadens z.B. DNA-Gehalt im Schweif (Tail-DNA [%]), der sich aus der Fluoreszenzintensität der migrierten DNA im Verhältnis zur Intensität ungeschädigter DNA im Zellkern ergibt.

In den beiden folgenden Tabellen sind Einstellungen in der Auswertesoftware Komet 6.0 GLP z.B. zur Unterscheidung von Kometenkopf und Kometenschweif, Untergrund-definition und Einstellungen zur Vermeidung von Sättigungseffekten der Kamera mit anschließender Erläuterung aufgeführt (Tab. 3, Tab. 4). Diese Eigenschaften müssen an die Bedingungen im Anwenderlabor angepasst werden.

Tab. 3: Definition des Kometprotokolls in der Auswertesoftware Komet GLP 6.0

Komet-Software Einstellung	Head Threshold	Smoothing value	Tail Break length	Tail Threshold	Back-ground Heigth	Saturation Limit	Saturation Maximum
	5	5	0	10	20	20	254

Tab. 4: Erläuterungen der Softwareeinstellungen zur Etablierung der Auswerteparameter der Software Komet GLP 6.0

Head Threshold (%)	Signale mit 5 % der maximalen Kopfintensität über dem Untergrundsignal werden dem Zellkern zugeordnet
Smoothing value	Glätten der Intensitätsprofile (Integrale), nützlich bei Auswertungen mit hohem Untergrund/Rauschen
Tail Break length (µm)	ermöglicht Entscheidung ob Absinken der Intensitäten innerhalb des Schweifes unter Untergrundniveau zugelassen werden, z.B. bei Definition „0 µm“ wird der Schweif bei erstem Wert unter dem Untergrundsignal beendet
Tail Threshold/1000	Intensitätssignale mit mindestens 1 % der max. Kopfintensität über dem Untergrundsignal werden als Kometenschweif analysiert
Background Height	wichtig bei Experimenten mit hohem Untergrund bzw. Fluktuationen des Messsignals im Messkasten, bestimmt Größe des kleinen Rechtecks über dem Messkasten
Saturation Limit	bestimmt Zahl der gesättigten Pixel, die zur Analyse des Kometprofils akzeptiert werden. Sättigung der 8 bit CCD-Kamera bei Grau-Level (0)
Saturation Maximum	Bei Überschreiten des Limits von 254 wird die Analyse abgebrochen.

In der folgenden Abbildung sind Beispiele unbestrahlter und bestrahlter Zellen gezeigt, die Bilder C und D demonstrieren die Funktion der Auswertesoftware (Unterscheidung von Zellkern und gewanderter DNA (Abb. 5).

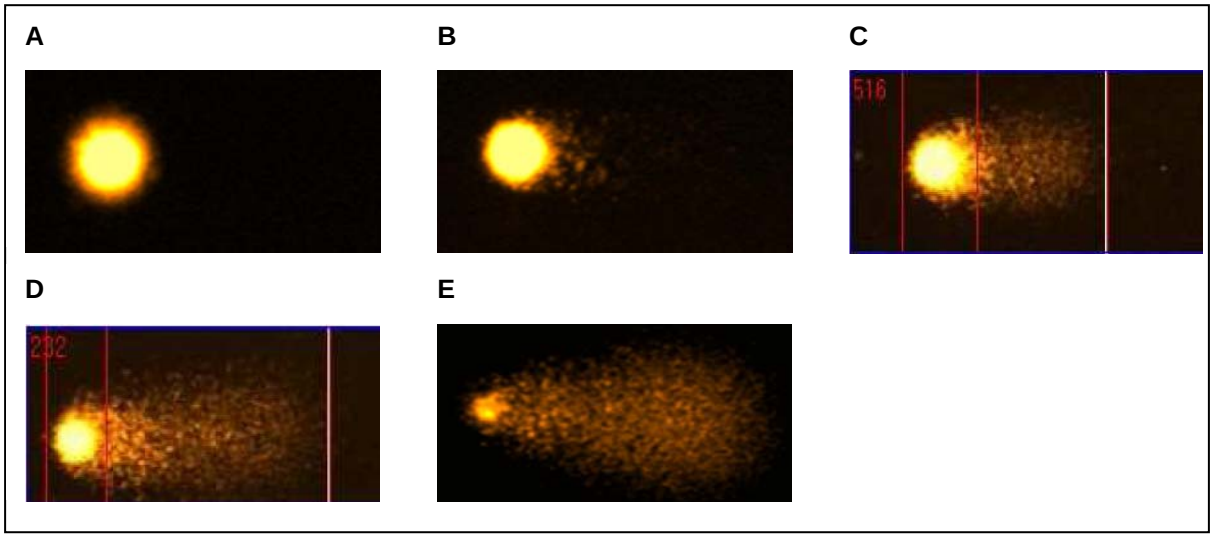

Abb. 5: Beispielbilder von Lymphozyten nach Bestrahlung mit ^{188}Re im alkalischen Komet-Assay mit unterschiedlicher DNA-Schädigung A: ungeschädigter Zellkern (0 Gy) B: schwache Schädigung (2,2 Gy) C: DNA-Schäden nach 5 Gy D: starke Schädigung (7,5 Gy) E: apoptotische Zelle. Die Markierungen in den Bildern C und D demonstrieren die Anteile von ungeschädigter DNA im Zellkern und migrierter DNA außerhalb des Kerns.

2.3.2.2 Neutraler Komet-Assay

Die untere Nachweisgrenze (Sensitivität) des Neutralen Komet-Assays liegt bei 5 Gy [157] bis 10 Gy [219], aus diesem Grund müssen höhere Energiedosen bei der Bestrahlung gewählt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Experimenten mit ^{188}Re nach 30 min ein Aliquot aus der Zellsuspension entnommen, dies entsprach einer Dosis von 10 Gy. In den Versuchen mit ^{211}At wurde aus Zeit- und Kapazitätsgründen nach 60 min die erste Probe entnommen, für dieses Zellaliquot entsprach die Dosis 20 Gy. Die Untersuchungen zum Reparaturverhalten erfolgten analog zum Protokoll des alkalischen Komet-Assays, siehe Absatz 2.3.2.1.

Die Etablierung des neutralen Assays wurde mit dem Zytostatikum Doxorubicin als DSB-induzierendes Agenz durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Optimierung der Versuchsbedingungen hinsichtlich des pH-Wertes sowie der Lyse- und Elektrophoreseparameter erfolgte in Vorversuchen. So wurde beispielsweise nach einem Protokoll von Olive mit Temperaturen von 40 °C während der Lyse gearbeitet [157]. Im Ergebnis zeigte sich bereits bei den unbehandelten Kontrollzellen ein deutlicher Anteil migrierter DNA außerhalb des Zellkerns. Auch bei Erhöhung der Spannung auf 1,5-2 V/cm bei der elektrophoretischen Auftrennung der DNA wurden bereits bei den Kontrollzellen migrierte DNA-Anteile identifiziert. Mit der Spannung von 1 V/cm konnte der Anteil gewanderter DNA bei den Kontrollen auf ein Minimum reduziert werden.

Als Ergebnis der Voruntersuchungen zur Validierung des neutralen Komet-Assays wurde eine modifizierte Version des Essen-Protokolls von Müller et al. [132] zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen angewandt.

<u>Denaturierung und Elektrophorese</u>

Die Herstellung der Objektträger sowie Mikroskopie und Auswertung erfolgten wie bei der alkalischen Komet-Version (vgl. 2.3.1.1).

Im Unterschied zum alkalischen Assay wurde für die Lyse bei pH 9,5 Na_2EDTA-Puffer in Gegenwart von Detergenz (ohne Hydroxidionen) verwendet, um die Auftrennung der beiden DNA-Stränge zu vermeiden. Die Lysezeit betrug mindestens 15 min und maximal 6 h, gefolgt von einem Waschschritt mit destilliertem Wasser über 5 min bei 18 °C in einem Inkubator. Die Versuchsbedingungen während der Elektrophorese waren folgende: Tris-Borat-Puffer pH 8,3 bei einer Spannung von 1,0 V/cm (30 V). Die elektrophoretische Trennung lief 5 min, die Elektrophoresekammer wurde in einem Eisbad gelagert. Anschließend wurden die Objektträger 10 min mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht luftgetrocknet.

Mikroskopie und Auswertung

Die weitere Auswertung entsprach der Durchführung des alkalischen Komet-Protokolls. Die DNA-Schäden wurden mit dem OTM quantifiziert.

2.3.2 Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenzmessung mussten zunächst Objektträger (Superfrost) mit Lysin (0,1 % in PBS) beschichtet werden. Nach dem Trocknen wurden pro Objektträger mit einem Dako-Pen zwei hydrophobe Bereiche markiert.

Die Bestrahlungen wurden mit ^{188}Re in 2 ml Zellsuspension mit 5x10^6 Zellen/ml durchgeführt, während die Inkubation mit ^{211}At aus Gründen der verfügbaren Gesamtradioaktivität der ^{211}At-Lieferung in 1 ml Suspension mit 5x10^6 Zellen/ml stattfand (vgl. Tab. 5).

Tab. 5: Dosis und Radioaktivität pro Probegefäß bei Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re für γ-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie

Astat-211		**Rhenium-188**	
Dosis [Gy]	Radioaktivität [MBq/ml]	Dosis [Gy]	Radioaktivität [MBq/ml]
0	0	0	0
0,05	0,007	0,5	0,07
0,10	0,014	1,0	1,37
0,50	0,070	2,0	2,75
1,00	0,140	5,0	7,00

Zur Bestimmung des Reparaturvermögens wurde der Rückgang der Foci-Anzahl pro Zellkern herangezogen. Der experimentelle Teil dazu umfasste die Inkubation der Lymphozyten in 25 cm^2 Zellkulturflaschen über 2 h, 4 h und 24 h. Der erste Zeitpunkt nach Bestrahlung wurde als 10 min-Wert definiert, da die Zellen diese Zeit benötigten, um bei Raumtemperatur auf dem Objektträger anzutrocknen.

Von den bestrahlten Zellsuspensionen wurden sofort nach Bestrahlung und nach der entsprechenden Reparaturzeit auf jeden Objektträger 2 x 5 µl (7-8x10^4 Zellen) in den markierten Bereich pipettiert. Nach ca.10 min waren die Zellen vollständig sedimentiert und getrocknet. Die anschließende Fixierung der Zellen erfolgte durch 15 min Inkubation in einer 4%igen Formaldehydlösung. Die Präparate wurden 3x5 min mit PBS gewaschen und bis zur Färbung 24 h bei 4 °C in PBS gelagert.

Die fixierten Zellen wurden nach 24 h mit Triton X100 (0,1 % in PBS) 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde 30 min mit Blockierungspuffer BSA (1 % in PBS) inkubiert. Anschließend wurde ohne Waschschritt

der Primärantikörper (Upstate, anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW 301) 1:800 in Blockierungspuffer verdünnt, 80 µl auf die Zellpräparate pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ein dreimaliges Waschen (5 min mit PBS) erfolgte, bevor die Zellen mit dem Sekundärantikörper (invitrogen, Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG) 1:400 in Blockierungspuffer verdünnt, 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt wurden (vgl. Schema der Abb 6). Danach wurden die Objektträger erneut 3x5 min mit PBS gewaschen.

Abb. 6: Schematische Darstellung der Antikörpermarkierung der phosphorylierten Histone aus www.DPG2004SYWS1.1 Löbrich: Reparatur nach niedrigen Strahlendosen und rechts Beispielaufnahme bestrahlter Lymphozyten, 1 Gy ^{188}Re nach 2 h Reparaturzeit, Vergrößerung 100x.

Die Zellkernfärbung wurde mit DAPI (10 µg/ml) 10 min im Dunkeln durchgeführt, gefolgt von drei Waschschritten (3x5 min, PBS). Nach dem Eindecken der Präparate mit Fluorescence mounting medium (Eindeckmedium) konnten die Objekträger bis zur Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt werden. Die Zählung der γ-H2AX-Foci erfolgte bei der Emissionswellenlänge von λ=594 nm (Alexa Fluor 594) und die Auswertung der Kernfärbung mit DAPI (Anregung λ=360 nm, Emission λ=450 nm) am Fluoreszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Pro Dosispunkt wurden in mindestens 100 Zellkernen die Foci gezählt. Eine stichprobenartige Kontrolle der Kernintegrität wurde durch Betrachtung der Zellen mit dem für DAPI geeigneten Filtersatz (360-450 nm) realisiert.

2.3.3 Annexin V-FITC/PI-Durchflusszytometrie

Die technische Funktionsweise eines Durchflusszytometers (FACS, fluorescence activated cell sorting) ist die Abtastung von Zellen mit monochromatischem Licht eines Laserstrahls. Durch Nachweis der Lichtbeugung und Lichtstreuung erhält man Informationen zur Morphologie wie Zellgröße, Granularität des Zytoplasmas (FSC = Forward Scatter: Zellgröße; SCC = Sideward Scatter: Granularität). Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt durch die Energie des Laserstrahls, die Emission der Photonen ist aufgrund der

substanzspezifischen Emissionsspektren für jedes Fluoreszenzmolekül unterschiedlich.
Der programmierte Zelltod ist gekennzeichnet durch den Verlust der Plasmamembranintegrität, die Kondensation des Zytoplasmas und des Zellkerns sowie der Spaltung der DNA. In der frühen Phase der Apoptose wandert (translokalisiert) das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) aus der inneren Membranschicht auf die Außenseite der Zellmembran. Annexin V ist ein 35–36 kDa schweres Ca^{2+} abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, das sich durch eine hohe Affinität zu PS auszeichnet und an Zellen mit exponiertem PS bindet. Die Kopplung von Annexin V mit Fluorescinisothiocyanat (FITC) ermöglicht die Quantifizierung apoptotischer Zellen (im Weiteren Annexin V). Propidiumiodid (PI) ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der die Analyse des Zellkerns erlaubt. Nach der FACS-Analyse erhält man drei Kategorien von Zellen: Annexin V-positive Zellen (Apoptose), Annexin V-positive und PI-aufnehmende Zellen (Spätapoptose/Nekrose) sowie ungeschädigte Zellen, die weder Annexin V noch PI aufnehmen (vgl. Abb. 7).

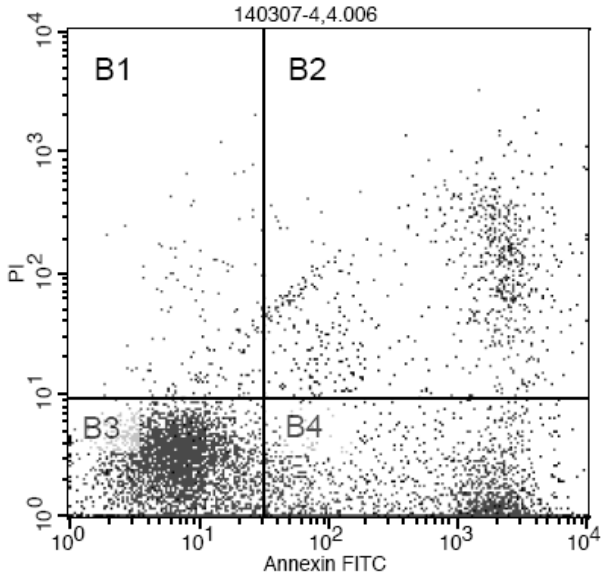

Abb. 7: Dotplot-Histogramm (Färbung von Lymphozyten mit Annexin V und Propidiumiodid), **B1**: PI-positive Zellen, **B2**: Annexin V-positive + PI-positive Zellen (spätes Apoptosestadium, Nekrose), **B3**: vitale Zellen, **B4**: Annexin V-positive + PI-negative Zellen (frühes Apoptosestadium)

Wie bei der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Bestrahlung bei 4 °C mit ^{188}Re in 2 ml Volumen durchgeführt, während die Inkubation mit ^{211}At in 1 ml Suspension stattfand. Die Zieldosis wurde durch Bestrahlung mit unterschiedlichen Radioaktivitätskonzentrationen und der Bestrahlungszeit von 2 Stunden (schütteln) eingestellt (Tab. 2). Durch Waschschritte (vgl. 2.3) wurde die Restradioaktivität entfernt und im Anschluss für alle Dosispunkte die Apoptoserate mit dem Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Alexis Biochemicals)

bestimmt. Da die Zellen während der Bearbeitung bei Raumtemperatur gehalten wurden, entspricht dieser Zeitpunkt dem 1 h-Wert im Ergebnisteil.

Zur Erfassung der Apoptoseinduktion nach längeren Zeiten wurden die Lymphozyten in 25 cm^2 Zellkulturflaschen über 24 h und 44 h inkubiert und am Tag 1 und Tag 2 nach Zellbestrahlung das Protokoll des Apoptosis Detection Kits entsprechend der folgenden Beschreibung bearbeitet. Die Messung der Apoptose nach Bestrahlung mit ^{211}At bzw. ^{188}Re wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (vgl. Tab. 6). Zur Überprüfung der unspezifischen Bindung des Antikörpes wurde zusätzlich zur Vorschrift eine Inkubaton der Zellsuspension mit IgG vorgenommen. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 10.000 Zellen gemessen, wobei Annexin V-FITC gefärbte Zellen im FL1 Kanal bei einer Wellenlänge von 530 nm (grün) und Propidiumiodid gefärbte Zellen im FL3 Kanal bei einer Wellenlänge von 650 nm (rot) registriert wurden.

Die Zellen wurden in 1,5 ml FACS-Bindungspuffer (BP) aufgenommen und pro Dosispunkt 0,5x10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert.

Tab. 6: Pipettierschema nach dem Apoptose Detektions Kit

IgG	Annexin	Annexin + PI
Zellpelett 0,5 x10^6 Zellen		
10 µl IgG+190 µl BP	5 µl Annexin+195 µl BP	5 µl Annexin+195 µl BP
vortexen		
10 min inkubieren, lichtgeschützt bei RT		
+ 2 ml Bindungspuffer		
Zentrifugieren 200 g		
Dekantieren		
+ 380 µl BP		
direkt vor Messung 20 µl PI		direkt vor Messung 20 µl PI

Annexin V-positive und PI-negative Zellen befinden sich in der frühen Apoptosephase, während Zellen, die für beide Marker positiv sind, die Endphase der Apoptose durchlaufen oder nekrotisch sind (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Apoptosemarker

	Annexin V-FITC	Propidiumiodid
vitale Zellen	negativ	negativ
apoptotische Zellen	positiv	negativ
spätapoptotisch/nekrotische Zellen	positiv	positiv
Zellkerne	negativ	positiv

Die Informationen über Spezifität und Fluoreszenzintensität wurden grafisch als zweidimensionale Dotplots mit der Software CellQuest Pro dargestellt (vgl. Abb. 7).
Auf die Bestimmung der Apoptoserate der mit Doxorubicin behandelten Zellen wurde verzichtet, da durch die Eigenfluoreszenz des Doxorubicins eine Überlagerung mit Propidiumiodid eintritt (600-650 nm).

2.4 Statistik

2.4.1 Beschreibende Statistik

Komet-Assay

Alle Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Ein Versuch repräsentiert den Mittelwert aus 50 Zellen pro Dosispunkt. Für den alkalischen Komet-Assay standen je 2 Spender (^{211}At: A, B; ^{188}Re: C, D) zur Verfügung, wobei für ^{211}At der Spender A am Versuchstag 1 verwendet wurde und der Spender B an den Versuchstagen 2 und 3. Für ^{188}Re wurde Spender C am Versuchstag 1 eingesetzt und Spender D an den Versuchstagen 2 und 3. Jeder Datenpunkt der resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve (Mittelwert aus 3 Versuchen) beruht somit auf 3 Versuchen mit 2 unterschiedlichen Spendern (1xA, 2xB). Zur Auswertung wurden die arithmetrischen Mittelwerte aus den 3 Versuchen pro Dosispunkt berechnet und die gemittelte Standardabweichung (pooled variance) nach folgender Gleichung benutzt.

$$s = \frac{s_1(n_1 - 1) + s_2(n_2 - 1) + s_3(n_3 - 1)}{(n_1 + n_2 + n_3) - 3}$$

Für die Durchführung des neutralen Komet-Assays wurden bei den ^{211}At-Versuchen die Proben der Spender A und B verwendet (alkalische Komet-Variante), bei den Rhenium-versuchen handelte es sich um 3 neue Spender (E, F, G). Da das Radionuklid ^{211}At auf Grund seiner Verfügbarkeit eine Sonderstellung einnimmt, wurden bevorzugt alle biologischen Methoden mit einer Astatlieferung abgearbeitet und die Versuche mit ^{188}Re an anderen Tagen durchgeführt.
Der Test auf Normalverteilung der Messwerte mit der Software SPSS 15.0 erfolgte mit Deskriptiver Statistik (Kolmogorov-Smirnov Test sowie mit dem Shapiro- Wilk Test).

Die Doxorubicin-Ergebnisse beruhen auf 3 Versuchen mit 3 verschiedenen Spendern. Ausgewertet wurden 100 Zellen pro Konzentration. Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen für einen Versuch sowie die Berechnung der Mittelwerte aus 3 Versuchen erfolgte analog den Berechnungen im Komet-Assay.

Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Experimente mit ^{211}At und ^{188}Re wurden in vier unabhängigen Versuchen durchgeführt. Ein Versuch repräsentiert den Mittelwert aus 100 Zellen pro Dosispunkt. Jeder Datenpunkt der Dosis-Wirkungs-Kurve (Mittelwert aus 4 Versuchen) beruht somit auf 4 Versuchen mit 4 unterschiedlichen Spendern (je 1 Probe pro Spender) für beide Radionuklide (insgesamt 8 Spender). Die gemittelte Standardabweichung wurde wie beim Komet-Assay berechnet.
Für die Experimente mit Doxorubicin gibt es Übereinstimmung mit dem Komet-Assay hinsichtlich der Spender. Die beiden Versuche wurden aus dem Lymphozytenpool des Komet-Assays durchgeführt (gleicher Ansatz). Berechnet wurden pro Konzentration Mittelwerte aus 180 Einzelzellen und deren Standardabweichung. Die Berechnung der Mittelwerte aus 2 Versuchen erfolgte analog den Berechnungen im Komet-Assay.

Durchflusszytometrie (FACS)

Die Messungen der Apoptoserate mit dem Annexin V-/PI Test wurden aus dem gleichen Ansatz wie das γ–H2AX Protokoll bearbeitet und somit standen für jedes Nuklid die identischen Lymphozytenproben zur Verfügung (8 Spender). Pro Dosis wurden am FACS 10 x10^3 Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte der DWK (Mittelwert aus 4 Versuchen) beruht auf den Mittelwerten aus 4 Versuchen mit 4 unterschiedlichen Spendern (je 1 Probe pro Spender) für jedes Radionuklid (insgesamt 8 Spender vgl. γ–H2AX).

2.4.2 Vergleichende Statistik

Die statistische Auswertung mit vergleichenden Methoden wurde am Institut für Medizinische Informatik und Biometrie für die Methoden alkalischer und neutraler Komet-Assay durchgeführt. Da das Ziel der Vergleich der biologischen Wirkung der Nuklide war, wurden die mit dem alkalischen Testsystem erzeugten Messwerte von ^{211}At und ^{188}Re miteinander verglichen. Der Nuklidvergleich anhand der Ergebnisse der Neutralen Komet-Version erfolgte analog der Vorgehensweise beim alkalischen Komet-Assay.

Alkalischer Komet-Assay - Vergleich ^{188}Re und ^{211}At

Um die biologische Wirkung der Nuklide zu vergleichen, wurde der Dosispunkt 5 Gy ausgewählt. Da bei den Bestrahlungen mit ^{211}At keine Messwerte für 5 Gy vorlagen, wurden die Messpunkte unter Benutzung der benachbarten Stützstellen 4,3 Gy und 8,2 Gy auf 5 Gy linear adjustiert. Diese Dosis wurde für den Nuklidvergleich ausgesucht, weil 5 Gy einem mittleren Dosisbereich entsprechen und der DNA-Schaden bis 5 Gy im verwendeten Modell eine begrenzte Abhängigkeit von der Dosis zeigte und somit der Dosiseinfluss auf den Nuklidvergleich minimiert werden konnte. Der Vergleich der Messgrößen zwischen den

beiden Nukliden wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt.

Für die statistische Auswertung der Messwerte, die mit den Methoden Gamma-H2AX-Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (Annexin V/PI) erzielt wurden, fanden die Parameter der beschreibenden Statistik mit Mittelwerten und Standardabweichung Anwendung. In Einzelfällen wurde bei Auswertung der Gamma-H2AX-Daten der T-Test (Excel) verwendet (vgl. 2.6.1).

3. Ergebnisse

3.1 Detektion von initialen DNA-Schäden mit dem Komet-Assay

Zur Bestimmung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA sowie zur qualitativen Unterscheidung der DNA-Schäden nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re wurden der alkalische Komet-Assay (ESB+DSB) sowie die neutrale Komet-Variante (DSB) angewandt. Erwartet wurde eine höhere DNA-Schädigung nach Exposition der Lymphozyten mit dem Alpha-Emitter. Zudem sollte die DSB-induzierende Wirkung von ^{211}At im Vergleich zu ^{188}Re nachgewiesen werden. Betrachtungen zum Vergleich der biologischen Wirkung der Radionuklide sind im Abschnitt 4.6 zu finden.

3.1.1 Initiale DNA-Schäden nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re im alkalischen Komet-Assay

Zur Detektion der initialen DNA-Schäden wurden die mononukleären Blutzellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml (^{211}At) bzw. 4 ml (^{188}Re) bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung entsprechend den Bedingungen des alkalischen Komet-Assays behandelt, d.h. die Lyse erfolgte bei pH=10 und die Elektrophorese bei pH=13.

Zur Auswertung der DNA-Schäden wurde der Parameter Olive Tail Moment (OTM) herangezogen, der den relativen DNA-Anteil außerhalb des Zellkernverbandes und die absolute Migration der DNA berücksichtigt.

Beide Strahlenqualitäten bewirkten lineare, dosisabhängige Anstiege der DNA-Schäden, die als Dosis-Wirkungs-Beziehungen dargestellt wurden. Die Resultate in Abb. 8 zeigten bei vergleichbarer Dosis für den Beta-Emitter ^{188}Re eine größere Anzahl von DNA-Strangbrüchen (ESB und DSB) als für den Alpha-Emittter ^{211}At.

Bei Bestrahlung mit ^{211}At wurde bei der Dosis von 10 Gy ein OTM von 6,8 erreicht, bei Bestrahlung mit ^{188}Re wurde bei 10 Gy ein OTM von 26,7 bestimmt (vgl. Abb. 8). Die Relationen der Anstiege von ^{188}Re und ^{211}At im linearen Kurvenfit zeigten ein Verhältnis von 5:1 (^{188}Re: y=2,48x; ^{211}At: y=0,53x).

Der Vergleich der biologischen Wirkung bei einzelnen Dosispunkten wurde mit Hilfe der Geradengleichungen der Kurvenanpassungen realisiert, da keine Messwerte bei übereinstimmenden Punkten vorlagen. Bei den Dosen von 2 Gy / 5 Gy und 10 Gy war das Verhältnis der biologischen Wirkung (^{188}Re/^{211}At) 1,8 / 2,8 und 3,5. Mit steigender Energiedosis verdeutlichte sich die höhere biologische Wirkung von ^{188}Re. Diese Wirkung gilt für die Detektion der DNA-Schäden im alkalischen Komet-Assay.

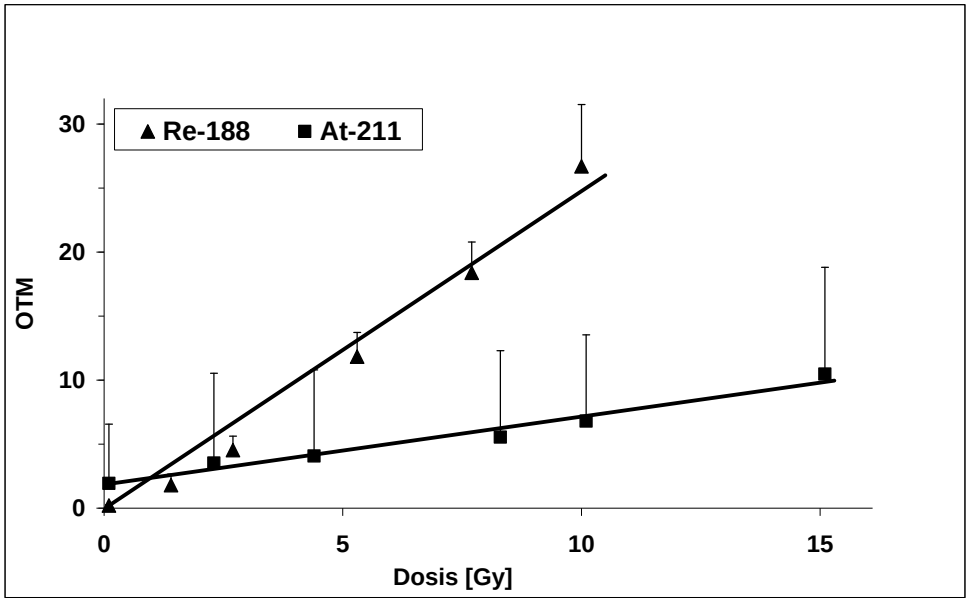

Abb. 8: Induktion der initialen DNA-Schäden an Lymphozyten mit ^{211}At und ^{188}Re im alkalischen Komet-Assay in Abhängigkeit von der Dosis. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (2x2 Spender, davon 1 Spender mit 2 Proben) mit der gemittelten Standardabweichung (SD) der 3 Versuche. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Standardabweichung nur in einer Richtung aufgetragen. Die Bestrahlung erfolgte bei 4 °C über 4 h.

Die Varianzanalyse (ANOVA) ermittelte signifikante Unterschiede zwischen den Lymphozyten von Spendern, die mit ^{211}At bestrahlt wurden und den Lymphozyten von Spendern, die mit ^{188}Re bestrahlt wurden ($p<0.05$). Die Konfidenzintervalle (KI) verdeutlichten die Problematik der großen Streuung der Messwerte beim ^{211}At, da sich nur das 95 %-Konfidenzintervall der höchsten Dosis (15 Gy) vom Vertrauensbereich des KI der nächstkleineren Dosis signifikant unterschied. Bei ^{188}Re hingegen zeigten die Schätzungen mit den 95 %-Konfidenzintervallen für alle Dosispunkte keine Überlappung der Vertrauensbereiche und damit signifikante Unterschiede (vgl. 3.1.5).

Betrachtet man die Initialschäden in Abhängigkeit von der applizierten Radioaktivität, ergaben sich jedoch umgekehrte Verhältnisse. Das bedeutet, dass z.B. die DNA-Schäden für ^{211}At bei 3,65 MBq*h/ml auf ein OTM von 10,4 anstiegen, während mit ^{188}Re bei gleicher Anzahl der Kernumwandlungen ein OTM von 1,6 gemessen wurde (vgl. Abb. 9).

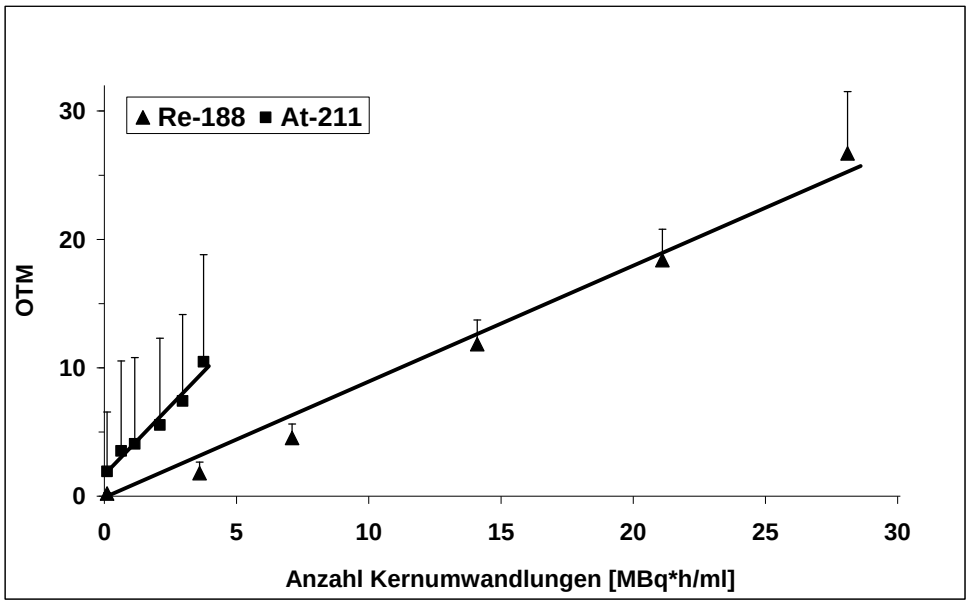

Abb. 9: Induktion der initialen DNA-Schäden mit ^{211}At und ^{188}Re im alkalischen Komet-Assay in Abhängigkeit von der Anzahl der Kernumwandlungen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (2x2 Spender, davon 1 Spender mit 2 Proben) mit der gemittelten Standardabweichung der 3 Versuche. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Standardabweichung nur in einer Richtung aufgetragen. Die Bestrahlung erfolgte bei 4 °C über 4 h.

Auffallend war die hohe Streuung der Messwerte bei Bestrahlung mit ^{211}At, die sowohl in der Bildergalerie (Abb. 10) als auch mit Hilfe der Histogramme (Abb. 12) demonstriert wurden. Zellmorphologisch wurde bei ^{211}At bis zu Dosen von 10 Gy ein heterogenes Schadensmuster mit ungeschädigten und geschädigten Zellen beobachtet (vgl. Abb. 10).

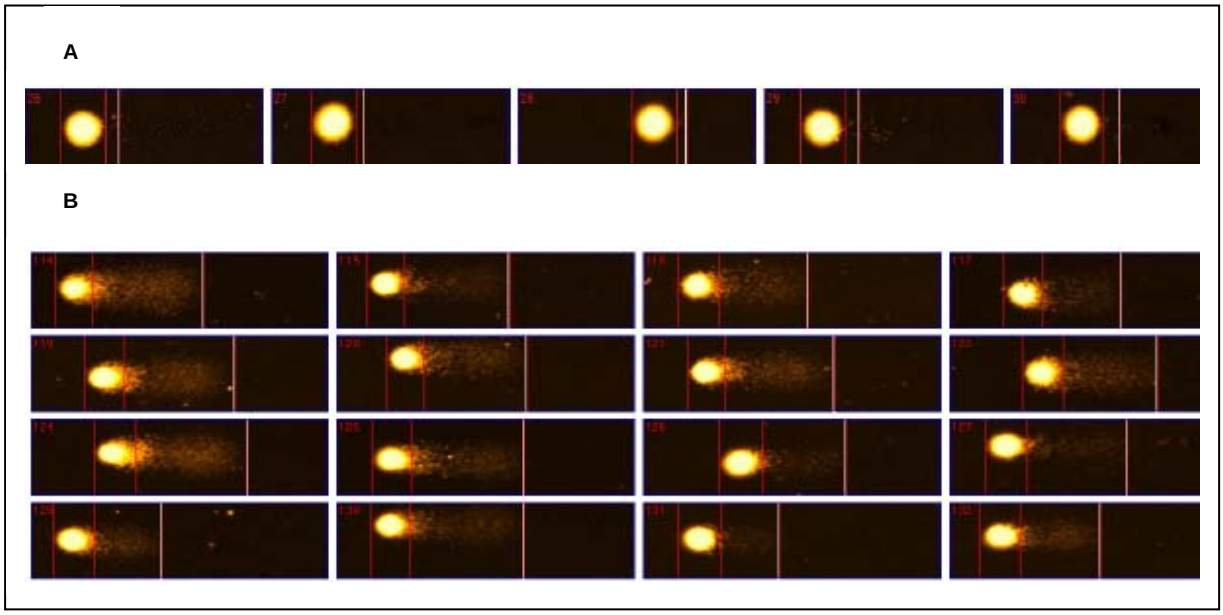

Abb. 10: Bildergalerie mit der Darstellung der initialen DNA-Schäden im alkalischen Komet-Assay nach Bestrahlung von Lymphozyten mit ^{211}At bei 4 °C; A: unbestrahlte Kontrollen B: 10 Gy

Die Bestrahlungsversuche mit ^{188}Re demonstrierten hingegen, dass ab Dosen >10 Gy keine verlässliche Messung der DNA-Schäden mehr möglich war (Apoptose/Nekrose). Nahezu alle Zellen der bestrahlten Suspension wiesen bei 10 Gy massive DNA-Schäden auf, die sich durch ein homogenes Schädigungsmuster auszeichneten (vgl. Abb. 11).

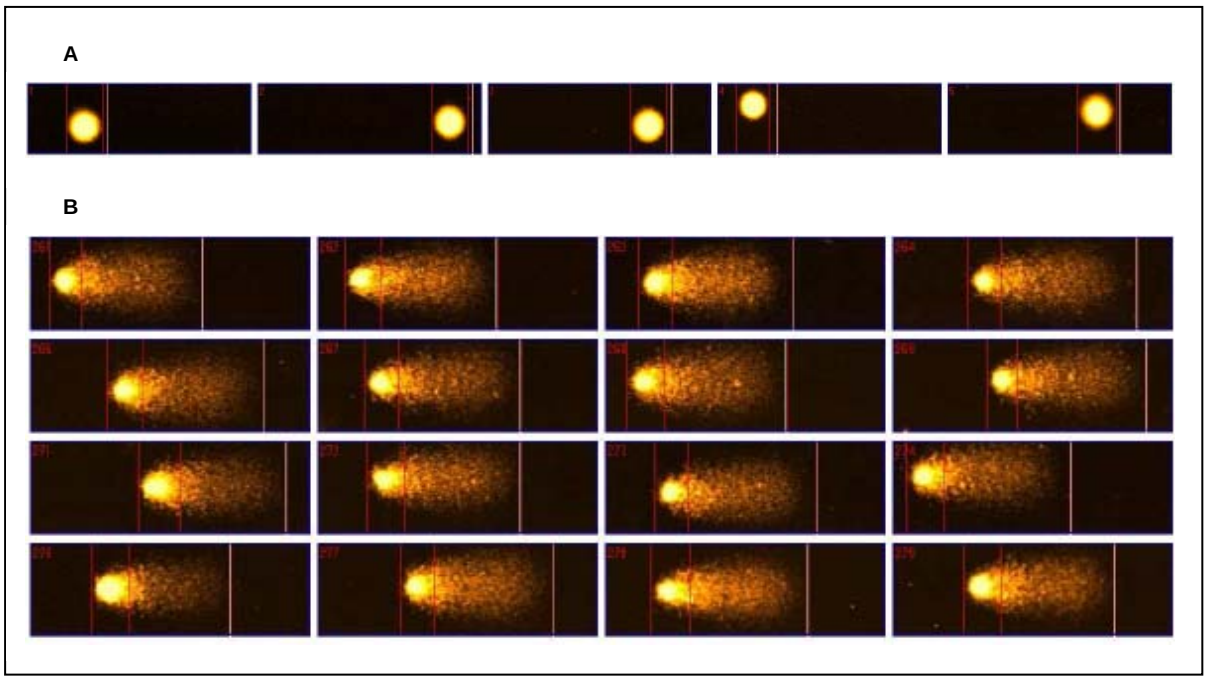

Abb. 11: Bildergalerie mit der Darstellung der initialen DNA-Schäden im alkalischen Komet-Assay nach Bestrahlung von Lymphozyten mit ^{188}Re bei 4 °C; A: unbestrahlte Kontrollen und B: 10 Gy

Die Auftragung der Häufigkeit der Messwerte mit einem bestimmten DNA-Schaden für ^{211}At und ^{188}Re resultierten in den dargestellten Verteilungshistogrammen (vgl. Abb. 12). Anhand dieser Darstellung lassen sich die Streuung der Einzelwerte sowie der Effekt der Bestrahlung demonstrieren. Auffallend war wiederum die Heterogenität der biologischen Wirkung (OTM) nach Bestrahlung mit ^{211}At (Abb. 12, Reihe B).

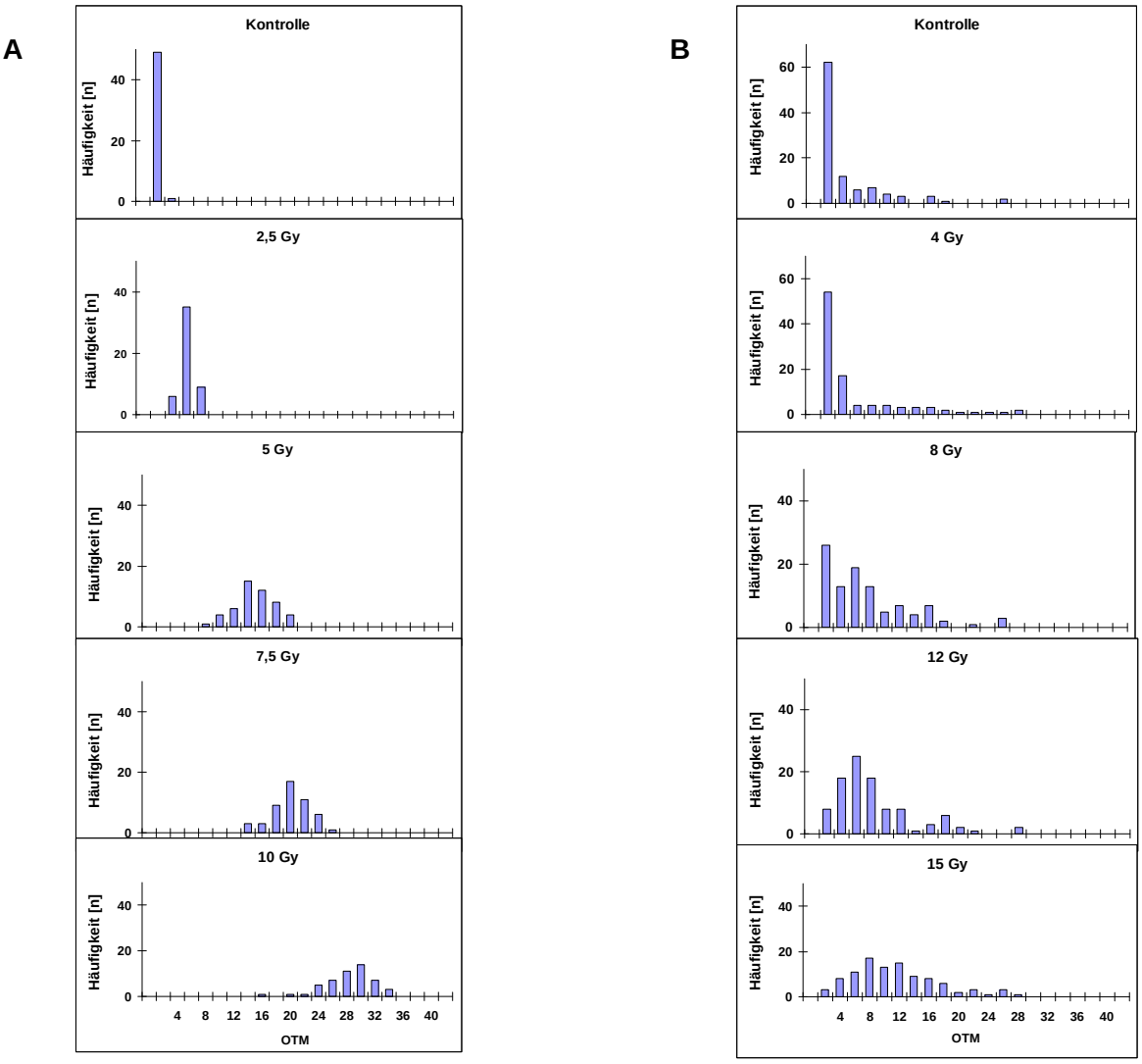

Abb. 12: Häufigkeitsverteilungen der initialen OTM; A: Bestrahlung mit ^{188}Re 0 Gy-10 Gy und B: Bestrahlung mit ^{211}At 0 Gy-15 Gy bei 4 °C

Die Testung der Nullhypothese, dass eine Stichprobe aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammt, erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov Test sowie mit dem Shapiro-Wilk Test (SPSS 15.0). Bei statistischer Signifikanz $p<0,05$ liegt keine Normalverteilung vor. Die Ergebnisse der Bestrahlungsversuche mit ^{188}Re zeigten eine annähernde Normalverteilung ($p>0,05$), während bei Bestrahlung mit ^{211}At bei allen Dosispunkten die Messwerte nicht normalverteilt ($p<0,001$) waren.

Eine mögliche Ursache für die nicht normalverteilten Werte bei ^{211}At könnte die sehr kurze Reichweite (max. 70 µm) der Alpha-Strahlung sein, da nur für einen Teil der Zellen eine Kernschädigung nachgewiesen wurde. Die Abschätzung der theoretischen Trefferanzahl pro Zelle für 1 Gy ^{211}At ergibt etwa 3 Treffer pro Zelle, für ^{188}Re beträgt die Trefferanzahl hingegen 1300. Die Berechnung basiert auf dem Kernradius von 4 µm für Lymphozyten, dem

mittlereren Energieverlust von etwa 100 keV/µm für ^{211}At sowie dem mittleren Energieverlust für ^{188}Re von 0,19 keV/µm. Eine umfassende Erörterung zur Trefferanzahl und den resultierenden DNA-Schäden erfolgt im Diskussionsteil (4.2.2).

3.1.2 Initiale DNA-Schäden nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re im neutralen Komet-Assay

Im Unterschied zum alkalischen Komet-Assay bei pH 13 wurde für die Elektrophorese ein Tris-Borat-Puffer mit pH 8,3 verwendet. Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse des neutralen Komet-Assays wurden parallel zu den Versuchen des alkalischen Assays durchgeführt. Es wurden in beiden Versuchsreihen Lymphozyten der gleichen Spender verwendet. Die initialen DNA-Schäden wurden als Tail-Moment quantifiziert. Für beide Strahlenqualitäten war ein Anstieg des Tail-Moments mit steigender Dosis zu sehen, bei 110 Gy betrug das OTM für ^{188}Re 13,5 und für ^{211}At 27,9 (vgl. Abb. 13).
Es konnten lineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden, wobei die Geradengleichungen (^{211}At: y=0,21x+4,5; ^{188}Re: y=0,09x+4,8) für ^{211}At im Vergleich zu ^{188}Re einen um den Faktor 2,3 höheren Anstieg erkennen ließen.

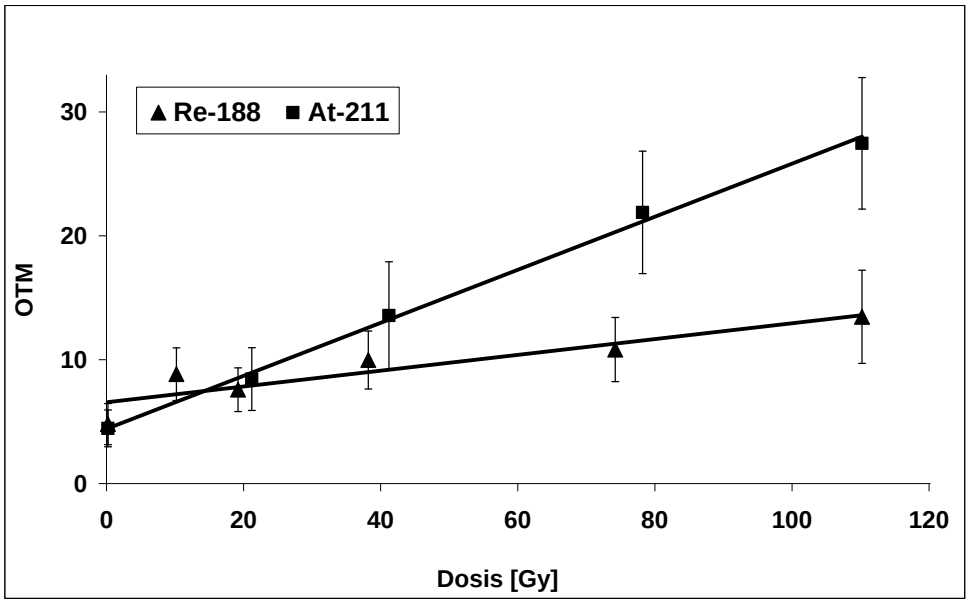

Abb. 13: Induktion der initialen DNA-Schäden an Lymphozyten mit ^{211}At und ^{188}Re im neutralen Komet-Assay in Abhängigkeit von der Dosis. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (2x2 Spender, davon 1 Spender mit 2 Proben) mit der gemittelten Standardabweichung der 3 Versuche. Die Bestrahlung erfolgte bei 4 °C über 4 h.

Die unterschiedliche Wirkung der Nuklide wurde wie beim alkalischen Assay mit den Geradengleichungen der Kurvenfits errechnet, indem der Quotient aus den OTM-Werten von

^{211}At und ^{188}Re gebildet wurde. Bei den Dosispunkten 20 Gy / 50 Gy und 100 Gy wurde für ^{211}At um die Faktoren 1,3 / 1,6 und 1,9 höhere OTM-Werte bestimmt. Anders als beim alkalischen Testsystem konnte hier mit steigender Dosis die höhere biologische Wirkung von ^{211}At verdeutlicht werden (siehe 4.6).

Wurden die Zellen mit 100 Gy ^{211}At sowie 100 Gy ^{188}Re bestrahlt, lag der Faktor für die höhere biologische Wirkung von ^{211}At bei etwa 2.

Die Berechnungen der Konfidenzintervalle ergaben für alle ^{211}At-Dosispunkte keine Überlappung der Vertrauensbereiche (vgl. 3.1.5), somit bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten für die entsprechenden Energiedosen.

Der Vergleich der KI für ^{188}Re ermittelte dagegen nur zwischen 0 Gy und 10 Gy, sowie zwischen 75 Gy und 110 Gy signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten (vgl. 3.1.5).

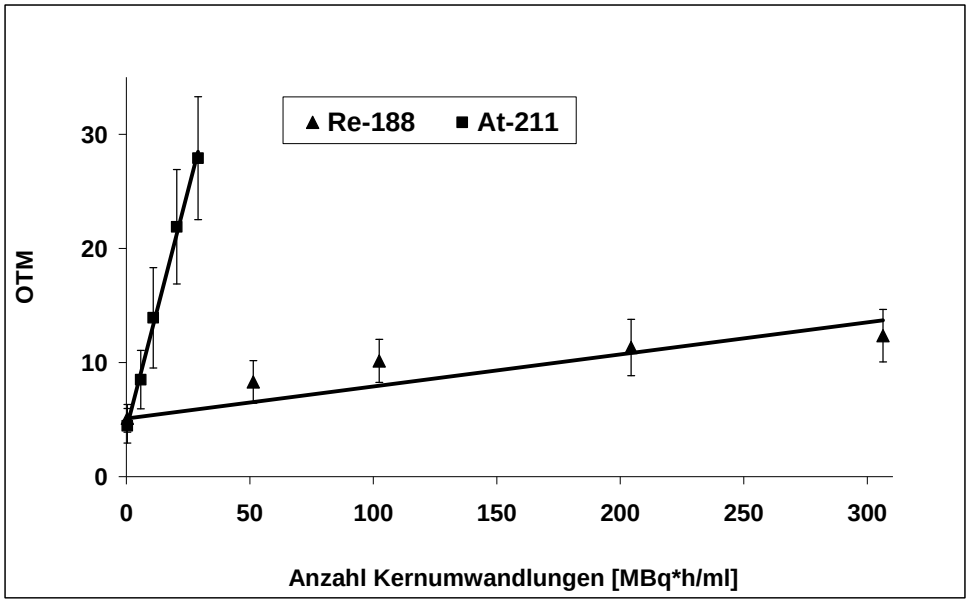

Abb. 14: Induktion der initialen DNA-Schäden an Lymphozyten mit ^{211}At und ^{188}Re im neutralen Komet-Assay in Abhängigkeit von der Anzahl der Kernumwandlungen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (2x2 Spender, davon 1 Spender mit 2 Proben) mit der gemittelten Standardabweichung der 3 Versuche. Die Bestrahlung erfolgte bei 4 °C über 4 h.

Die Darstellung des Tail-Moments als Funktion der applizierten Radioaktivität (MBq*h/ml) wie bei der alkalischen Komet-Variante (vgl. 3.1.1), verdeutlichte die unterschiedliche DNA-schädigende Wirkung der Strahlenqualitäten (vgl. Abb. 14). Bei Bestrahlung mit Alpha-strahlung erzeugten etwa 30 Kernumwandlungen ein Tail-Moment von 28, während der Beta-Strahler bei 300 Kernumwandlungen ein OTM von 12 induzierte. Diese Ergebnisse verdeutlichten die höhere biologische Wirkung des Alpha-Strahlers ^{211}At im Vergleich zum Beta-Strahler ^{188}Re.

Im Gegensatz zum alkalischen Komet-Protokoll waren bei der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen mit der neutralen Komet-Version die Messwerte der Bestrahlungsversuche mit ^{188}Re bei keinem Dosispunkt normalverteilt ($p<0,005$). Die Werte der ^{211}At-Versuche zeigten in Übereinstimmung mit dem alkalischen Komet-Assay keine Normalverteilung ($p<0,001$). Eine Ausnahme bildete der Messwert bei der höchsten ^{211}At-Dosis von 110 Gy ($p=0,2$).

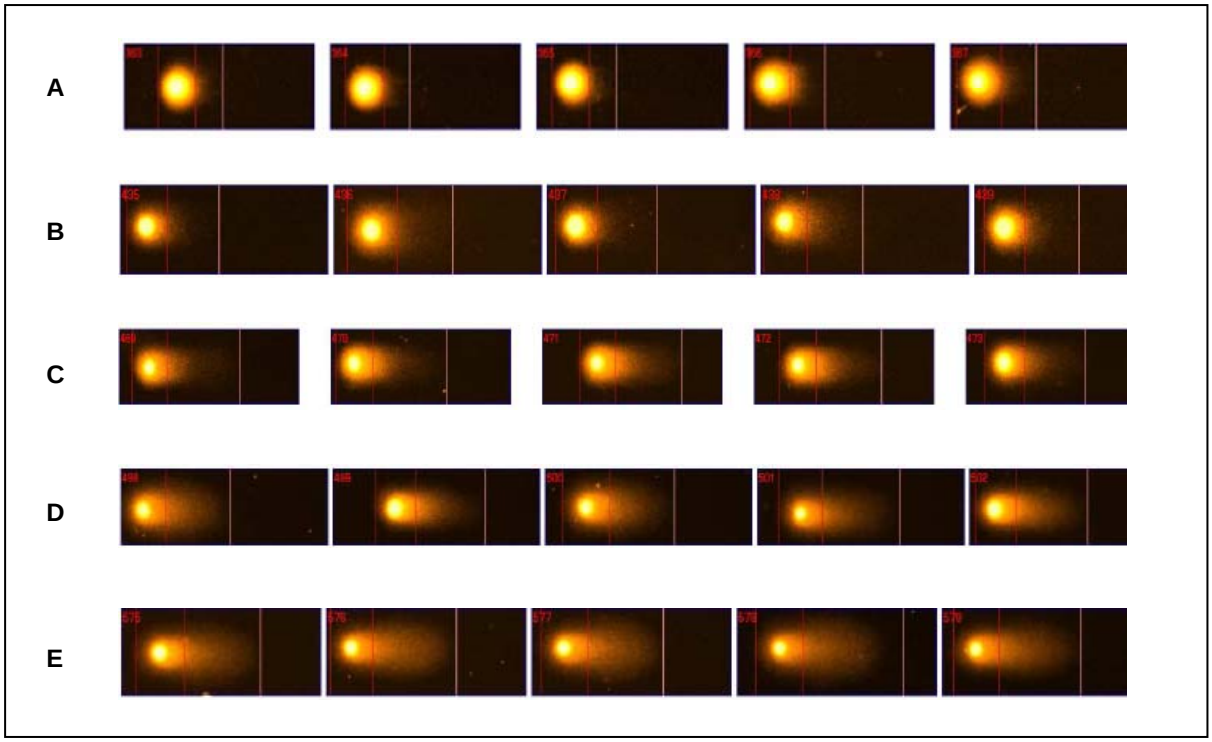

Abb. 15: Bildergalerie mit der Darstellung der initialen DNA-Schäden im neutralen Komet-Assay nach Bestrahlung von Lymphozyten bei 4 °C mit ^{211}At; A: unbestrahlte Kontrolle, B: 40 Gy ^{211}At, C: 75 Gy, D: 110 Gy

Die Bilder veranschaulichen die initiale Schädigung der Lymphozyten bei Anwendung des neutralen Komet-Protokolls nach Bestrahlung mit ^{211}At (vgl. Abb. 15) sowie mit ^{188}Re (vgl. Abb. 16).

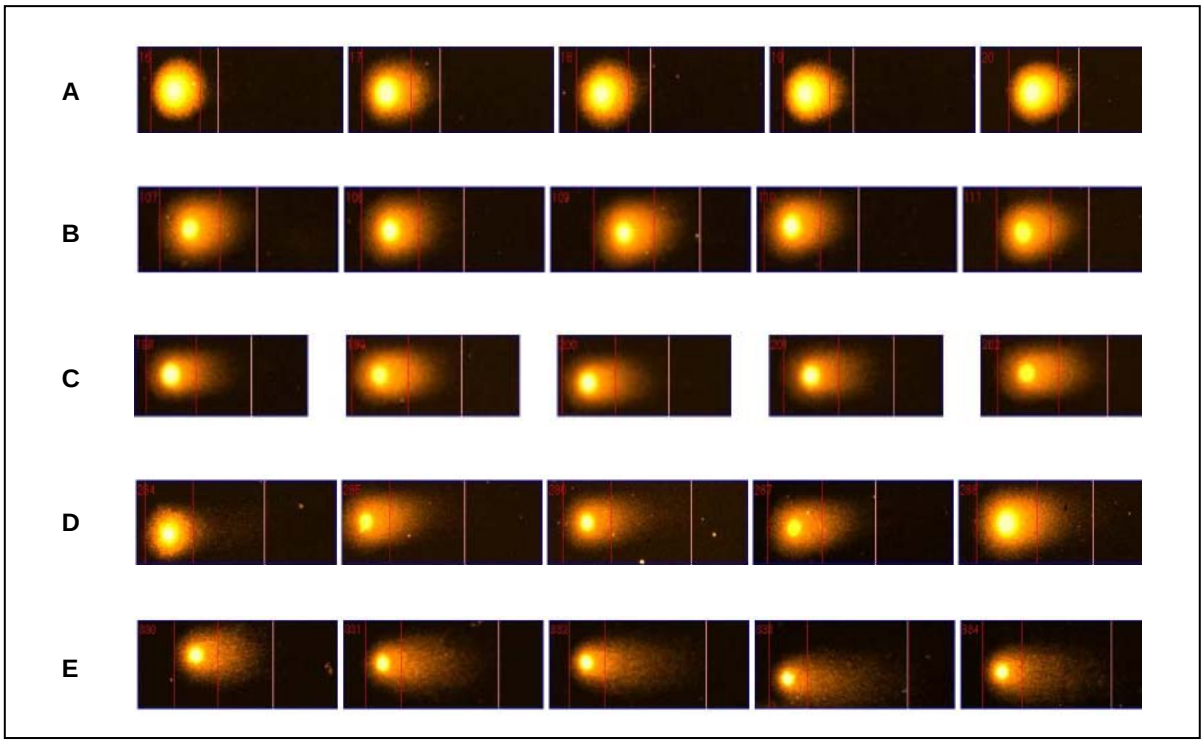

Abb. 16: Bildergalerie mit der Darstellung der initialen DNA-Schäden im neutralen Komet-Assay nach Bestrahlung von Lymphozyten mit ^{188}Re bei 4 °C; A: unbestrahlte Kontrolle B: 40 Gy, C: 75 Gy, D: 110 Gy

3.1.3 Effekt von Doxorubicin im alkalischen und neutralen Komet-Assay

Die Versuche mit Doxorubicin wurden zunächst zur Etablierung des neutralen Komet-Assays duchgeführt.

Die Inkubation der mononukleären Blutzellen mit Doxorubicin erfolgte über drei Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Die Wirkungsweise der Substanz ist nur bei physiologischen Temperaturen effektiv, da eine Interkalation in die DNA erfolgt. Bei Inkubation in der Kälte (4 °C) hingegen wurden keine oder nur geringfügige DNA-Schäden induziert, da bei 4 °C keine Aufnahme des Doxorubicins in die Zellen erfolgt. Diese Ergebnisse gehören zu den Vorversuchen und sind in der Arbeit nicht aufgeführt. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 0,1 - 40 µg/ml (0,17-68 µM) gewählt, der in etwa der physiologischen Dosierung von 0,2 - 3 µM entspricht. Nach Inkubationsende wurden für jede Konzentration zwei Objektträger präpariert, die entsprechend dem alkalischen bzw. neutralen Komet-Protokoll behandelt wurden. Als Maß für den DNA-Schaden wurde wie bei der Ergebnisdarstellung für die Radionuklide das OTM herangezogen.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des alkalischen Komet-Assays folgte einem flachen Anstieg. Bei einer Steigerung der Konzentration von Doxorubicin um den Faktor 10 wurde keine Erhöhung des DNA-Schadens gemessen, bei weiterer Konzentrationserhöhung um

den Faktor 40 stieg das OTM um das 1,1- bzw. bei der hundertfachen Konzentrationserhöhung um das 1,4-fache an. Die entsprechende Darstellung der DNA-Schädigung im neutralen Komet-Assay detektierte einen höheren Effekt des Doxorubicins auf die DNA, da die Konzentrationssteigerung um die Faktoren 10 bzw. 40 einen Anstieg des OTM um das 1,9-fache bzw. 1,8-fache sowie bei weiterer Konzentrationserhöhung (x100) um das 2,7-fache bewirkte. Bei vergleichbaren Konzentrationen konnten im neutralen Assay höhere DNA-Schäden gemessen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der vermuteten DSB-induzierenden Wirkung von Doxorubicin.

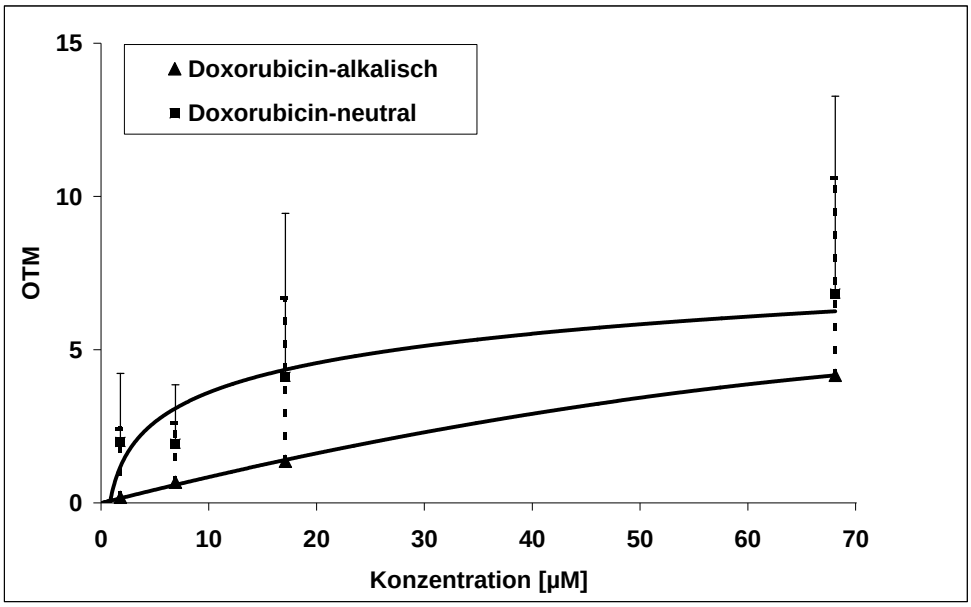

Abb. 17: DNA-Schäden nach Behandlung der PBMC mit Doxorubicin, Vergleich der OTM-Werte (normiert) im alkalischen und im neutralen Komet-Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (3 Spender) mit der gemitttelten Standardabweichung der 3 Versuche. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über 3 h.

Auffallend war, dass die Messwerte stark variierten, auch bei der größten Doxorubicin-Konzentration blieb ein erheblicher Anteil Zellen ohne Strangbrüche. Andererseits wurden mit steigender Doxorubicin-Konzentration eine wachsende Anzahl apoptotischer Zellen auf dem Objektträger beobachtet, die nicht in die Auswertung einbezogen wurden. Die hohe Varianz der Messwerte wird in der graphischen Darstellung durch die einfache Standardabweichung deutlich (vgl. Abb. 17). Mit dem Kolmogorov-Smirnov- und dem Shapiro-Wilk-Test konnte keine Normalverteilung der Messwerte bestätigt werden ($p<0,01$).

3.1.4 Vergleich der Ergebnisse des alkalischen und neutralen Komet-Assays

^{211}At und ^{188}Re

In den folgenden Diagrammen wurden die Messwerte (OTM), die in der jeweiligen Komet-Assay-Version analysiert wurden, für die drei DNA-schädigenden Noxen verglichen. Da die OTM-Werte der Kontrollzellen im alkalischen Komet-Protokoll deutlich vom OTM der Kontrollzellen im neutralen Assay abwichen, wurden die Messwerte der unbehandelten Zellen auf eins gesetzt. Mit diesen Werten wurde der Quotient aus den im alkalischen Komet-Assay bestimmten OTM-Werten und den Werten des OTM der neutralen Komet-Version gebildet (vgl. Tab. 8).

Die als DNA-Schäden gemessene Radiotoxizität von ^{211}At ist im alkalischen Komet-Assay höher als neutralen Komet Protokoll. Bei einer Dosis von 15 Gy ^{211}At wurde im alkalischen Assay ein normiertes OTM von 7,0 bestimmt, im Neutralen betrug das OTM bei gleicher Dosis 2,4. (Abb. 18, A) Die Bestrahlung der Zellen mit 10 Gy ^{188}Re ergab einen OTM-Wert von 44,8 im alkalischen Assay und im neutralen einen OTM-Wert von 1,6 (vgl. Abb. 18).

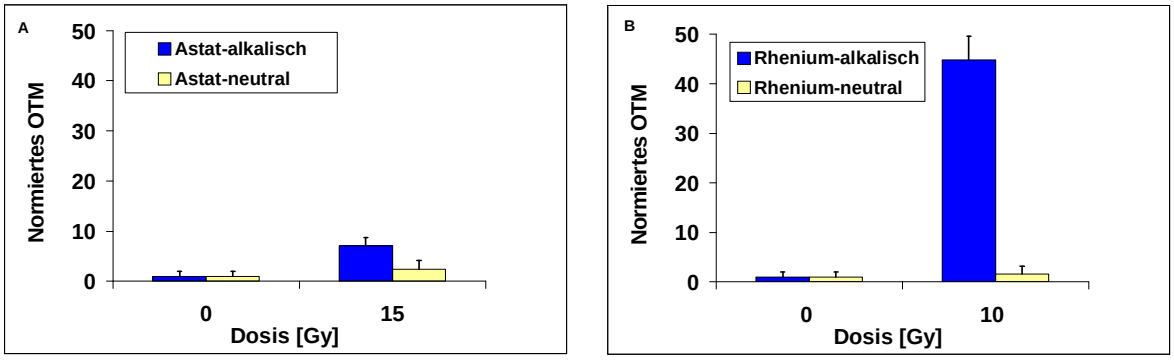

Abb. 18 A: Normiertes OTM nach Bestrahlung der PBMC mit 15 Gy ^{211}At und B: 10 Gy ^{188}Re Vergleich der normierten OTM-Werte im alkalischen und im neutralen Komet-Assay in Abhängigkeit von der Dosis, Mittelwerte aus 3 Versuchen und gemittelte Standardabweichung

Zum Vergleich der beiden Komet-Assay-Varianten konnte sowohl bei ^{211}At als auch bei ^{188}Re nur ein Dosispunkt herangezogen werden, da sich die Dosisbereiche nur in einem Punkt überschnitten.

Tab. 8: Normierte OTM-Werte und das Verhältnis des OTM alkalisch zu OTM neutral nach Bestrahlung der Lymphozyten mit 15 Gy ^{211}At und 10 Gy ^{188}Re

Dosis [Gy]	**15**	**Dosis [Gy]**	**10**
^{211}At-alkalisch OTM ± SD	7,0 ± 6,5	^{188}Re-alkalisch OTM ± SD	44,8 ± 7,8
^{211}At-neutral OTM ± SD	2,4 ± 1,8	^{188}Re-neutral OTM ± SD	1,6 ± 1,9
OTM alkalisch/ OTM neutral	**3,0**	**OTM alkalisch/ OTM neutral**	**27,5**

Vergleicht man die Quotienten der im Neutralen gemessenen DNA-Schäden mit den im alkalischen Assay gemessenen Schäden, findet man für ^{211}At den Faktor 3,0 und für ^{188} Re den Faktor 27,5. Das Verhältnis ESB/DSB ist damit beim Beta-Emitter ^{188}Re deutlich zur Seite der Einzelstrangbrüche (im alkalischen Komet-Assay hauptsächlich ESB) verschoben.

Doxorubicin

Nach der Schädigung der Zellen mit Doxorubicin wurde aus den normierten OTM-Werten der Quotient OTM alkalisch/OTM neutral berechnet. Der Vergleich der normierten OTM-Werte nach DNA-Schädigung mit Doxorubicin verdeutlichte, dass hinsichtlich der Qualität der Schäden die gleiche Anzahl Gesamtstrangbrüche (ESB+DSB) und Doppelstrangbrüche entstanden (vgl. Abb. 19).

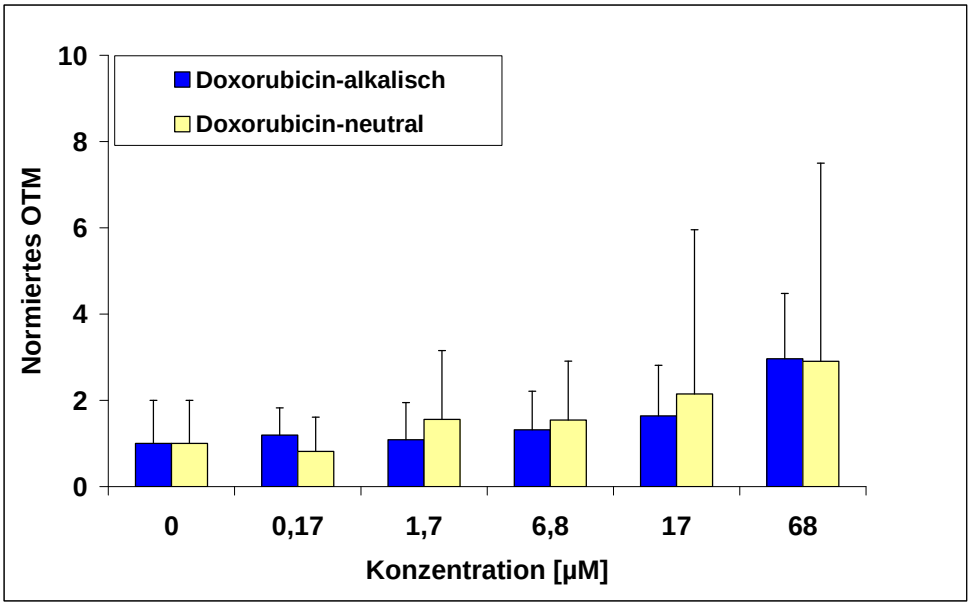

Abb. 19: Vergleich der normierten OTM-Werte im alkalischen und im neutralen Komet-Assay nach Behandlung der Lymphozyten mit Doxorubicin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen und die gemittelte Standardabweichung

Der errechnete Quotient betrug für die Konzentration ab 1,7 µM nahezu 1 (vgl. Tab. 9). Die Anzahl der gemessenen ESB+DSB (alkalisch) entsprach der Anzahl der DSB (neutral).

Tab. 9: Normierte OTM–Werte und Verhältnis des OTM alkalisch zu OTM neutral nach Behandlung der Lymphozyten mit Doxorubicin, Mittelwerte aus 3 Versuchen und gemittelte Standardabweichung

Konzentration [µM]	**0,2**	**1,7**	**6,8**	**17,0**	**68,0**
Doxorubicin-alkalisch OTM ± SD	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,8	1,3 ± 0,9	1,6 ± 1,2	3,0 ± 1,5
Doxorubicin-neutral OTM ± SD	0,8 ± 0,7	1,6 ± 1,6	1,5 ± 1,4	2,1 ± 3,8	2,9 ± 4,6
OTM alkalisch/ OTM neutral	**1,5**	**0,7**	**0,9**	**0,8**	**1,0**

3.1.5 Vergleichende Statistik im Komet-Assay

Alkalischer Komet-Assay - Vergleich ^{211}At und ^{188}Re

Der Vergleich der Messgrößen zwischen den beiden Nukliden wurde mit Varianzanalyse (ANOVA, Lineares Modell) durchgeführt. Für jedes Nuklid standen jeweils Proben zweier Spender für die Auswertung zur Verfügung. Die multiplen Mittelwertvergleiche (Tukey-HSD) erfolgten ohne Beachtung der verwendeten Nuklide nur zwischen den Spendern. Das Ergebnis verdeutlichte, dass sich die Mittelwerte der Spender, die mit demselben Nuklid bestrahlt wurden, nicht signifikant unterschieden (OTM: $p=0,612$ bzw. $p=0,113$), die Mittelwerte der Spender, die mit unterschiedlichen Nukliden bestrahlt wurden, jedoch signifikant unterschiedlich waren ($p<0,05$). Die Spender 1 und 2 wurden mit ^{188}Re bestrahlt und Spender 3 und 4 mit ^{211}At. Im Ergebnis waren die Messwerte bei gleicher Dosis nach ^{188}Re-Bestrahlung signifikant höher als die Messwerte nach ^{211}At-Bestrahlung. Die Unterschiede zwischen den Spendern waren zwar statistisch nicht signifikant, zeigten aber eine große Variabilität.

Tab. 10: Konfidenzintervalle der Mittelwerte von vier Spendern für die abhängige Variable OTM gemessen im alkalischen Komet-Assay

Spender	Mittelwert OTM	95 % Konfidenzintervall	
		Untergrenze	Obergrenze
1	15,34	13,61	17,08
2	12,92	11,69	14,14
3	3,35	1,72	5,19
4	4,78	3,55	6,00

Dosiseffekt auf den Parameter OTM für ^{211}At

Um die Gleichheit der Fehlervarianzen zu beurteilen, wurde zunächst der Levene-Test auf Varianzhomogenität durchgeführt. Es wurde keine Varianzhomogenität festgestellt (SPSS 15.0, Levene-Test $p<0,005$).

Die Untersuchung des Dosis-Einflusses auf das OTM wurde mit der Varianzanalyse (ANOVA), Lineares Modell bewertet. Dazu wurde ein Polynom an die Daten angepasst. Der Anstieg der OTM-Werte korrelierte mit der Dosis. Im Unterschied zu ^{188}Re war bei ^{211}At nur die lineare Komponente des Polynoms signifikant von Null verschieden. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die Schätzungen der 95 %-KI für die abhängige Variable OTM in Tab. 11 dargestellt. Im alkalischen Komet-Assay bestanden nur zwischen den Dosen 10 Gy und 15 Gy des Alpha-Strahlers ^{211}At signifikante Unterschiede.

Tab. 11: Dosiseinfluss von ^{211}At im alkalischen Komet-Assay für die abhängige Variable OTM. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der Mittelwerte von zwei Spendern als Funktion der Dosis.

Dosis Nuklid ^{211}At	Mittelwert OTM	95 % Konfidenzintervall	
		Untergrenze	Obergrenze
0,0 Gy	2,26	0,85	3,67
2,2 Gy	3,24	1,84	4,65
4,3 Gy	3,91	2,50	5,32
8,2 Gy	4,78	3,37	6,19
10,0 Gy	7,06	5,65	8,47
15,0 Gy	9,92	8,51	11,33

Dosiseffekt auf den Parameter OTM für ^{188}Re

Wie bei den Ergebnissen für ^{211}At wurde mit dem Levene-Test eine Varianzheterogenität festgestellt. Die Untersuchung des Dosis-Einflusses wurde ebenfalls wie bei ^{211}At mit ANOVA durchgeführt. Die Messwerte stiegen mit wachsender Dosis an. Beim Effekt von ^{188}Re war sowohl die lineare als auch die quadratische Komponente des Polynoms signifikant von Null verschieden.
Die Schätzungen der 95 %-KI für die abhängige Variable OTM demonstriert untenstehende Tabelle. Daraus geht hervor, dass sich die Mittelwerte in Abhängigkeit von der Dosis signifikant unterscheiden.

Tab. 12: Dosiseinfluss von ^{188}Re im alkalischen Komet-Assay für die abhängige Variable OTM. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der Mittelwerte von zwei Spendern als Funktion der Dosis.

Dosis	**Mittelwert**	**95% Konfidenzintervall**	
Nuklid ^{188}Re	**OTM**	**Untergrenze**	**Obergrenze**
0,0 Gy	**1,08**	**-0,09**	**2,24**
2,5 Gy	**6,85**	**5,69**	**8,01**
5,0 Gy	**14,30**	**13,14**	**15,47**
7,5 Gy	**23,98**	**22,81**	**25,14**
10,0 Gy	**34,37**	**33,20**	**35,53**

Neutraler Komet-Assay - Vergleich ^{211}At und ^{188}Re

Der Vergleich der Messgrößen zwischen den beiden Nukliden im neutralen Komet-Assay wurde wie im alkalischen Komet-Assay mit Varianzanalyse (Lineares Modell) durchgeführt.
Die univariate Varianzanalyse (Lineares Modell) vergleicht Gruppen von Einflussgrößen (2 Nuklide, Dosis mit 5 bzw. 6 Messstellen) über Mittelwertvergleiche.
Die Varinzanalyse berechnete signifikante Unterschiede zwischen den Dosispunkten für jedes Nuklid und zwischen den Nukliden im neutralen Komet-Assay (vgl. Tab. 13, Tab. 14).

Tab. 13: Dosiseinfluss von ^{211}At im neutralen Komet-Assay für die abhängige Variable OTM. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der Mittelwerte von drei Spendern als Funktion der Dosis.

Dosis Nuklid ^{211}At	Mittelwert OTM	95% Konfidenzintervall	
		Untergrenze	Obergrenze
0 Gy	4,46	3,84	5,08
20 Gy	8,42	7,79	9,04
40 Gy	12,67	11,91	13,44
75 Gy	21,89	21,27	22,52
110 Gy	27,90	26,93	28,47

Tab. 14: Dosiseinfluss von ^{188}Re im neutralen Komet-Assay für die abhängige Variable OTM. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der Mittelwerte von vier Spendern als Funktion der Dosis.

Dosis Nuklid ^{188}Re	Mittelwert OTM	95% Konfidenzintervall	
		Untergrenze	Obergrenze
0 Gy	4,84	4,30	5,38
10 Gy	8,89	8,35	9,43
20 Gy	8,62	8,08	9,16
40 Gy	9,98	9,44	10,52
75 Gy	10,82	10,28	11,36
110 Gy	13,46	12,92	14,00

3.2 Reparatur der initialen DNA-Schäden nach Exposition mit ^{211}At, ^{188}Re und Doxorubicin

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Reparaturkinetiken nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten liegen Studien vor, die ein unterschiedliches Reparaturvermögen in Abhängigkeit von der Strahlenqualität erwarten lassen. Zudem werden initiale DNA-Schäden von den Reparatursystemen in der Zelle in Abhängigkeit von der Qualität des DNA-Schadens (ESB/DSB) in unterschiedlicher Zeit eliminiert. Es sollte daher untersucht werden, ob ^{211}At und ^{188}Re ein unterschiedliches Reparaturverhalten der Lymphozyten verursachen und ob der alkalische bzw. neutrale Komet-Assay zu verschiedenen Ergebnissen kommen. Dazu wurden nach Erfassung der Initialschäden die Zellsuspensionen in frischem Kulturmedium bei 37 °C inkubiert.

Zur Berechnung der Reparaturkinetiken wurde für jeden untersuchten Dosispunkt die Initialschädigung auf 100 % Residualschaden definiert, die Werte der unbestrahlten Kontrollen der jeweiligen Versuchsreihe wurden von den Messwerten abgezogen.

Aus Gründen der Verfügbarkeit von ^{211}At wurden die Astat-Experimente an einem Versuchstag für alle Methoden durchgeführt und die Experimente mit ^{188}Re an anderen Versuchstagen, sodass für ^{211}At und ^{188}Re nicht die gleichen Lymphozytenspender verwendet werden konnten. Jede Versuchsreihe mit der Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven sowie der Reparaturkinetiken sowohl in der alkalischen als auch in der neutralen Komet-Version beruhten für ^{211}At und Doxorubicin auf identischen Spendern. Für die Versuche mit ^{188}Re basieren die Messwerte im alkalischen Komet-Assay auf anderem Spendermaterial als im neutralen Komet-Assay (vgl. 2.5.1)

3.2.1 Reparatur im alkalischen Komet-Assay

^{211}At

Das Reparaturvermögen der Zellen wurde in einem Zeitfenster von 1 h und 20 h für ^{211}At bzw. 2 h für ^{188}Re untersucht. Da mit der alkalischen Variante des Komet-Assays überwiegend Einzelstrangbruchreparatur analysiert wird, sind relativ kurze Reparaturzeiten ausgewählt worden.

Das Diagramm (vgl. Abb. 20) zeigt die Reparaturkinetik der initialen DNA-Schäden nach Bestrahlung der PBMC mit ^{211}At für zwei Dosispunkte. Nach 4 Gy erfolgte bis zu einer Stunde nach Bestrahlungsende eine geringfügige Reparatur bis auf 84 % des Initialschadens, nach Bestrahlung mit 10 Gy wurde nach einer Stunde noch 56 % Residualschaden gemessen. Erklärungen zum Effekt der erhöhten Reparaturkapazität nach der Dosis von 10 Gy ^{211}At im Vergleich zu 4 Gy sind im Abschnitt Diskusssion unter 4.2.3 angeführt.

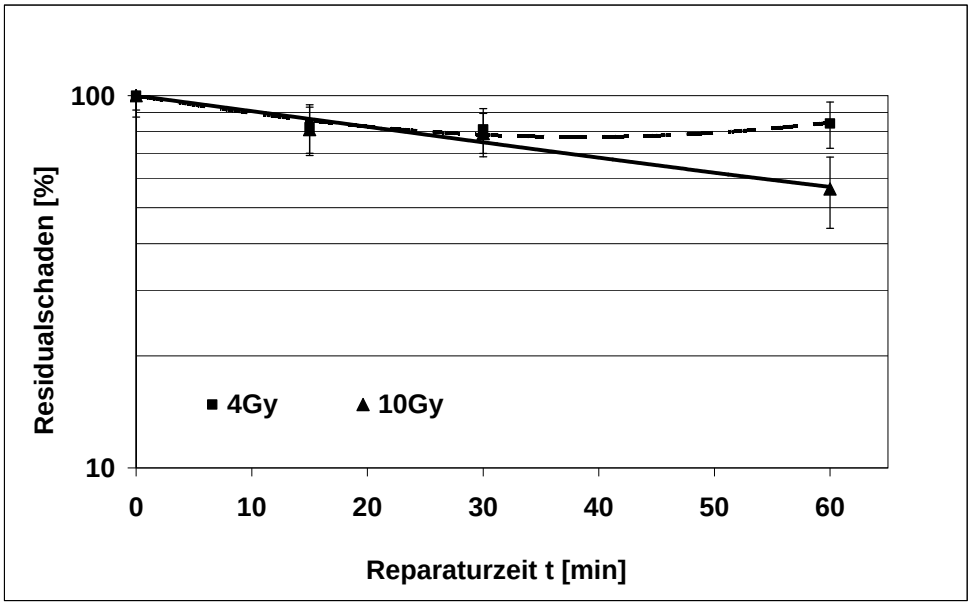

Abb. 20: Reparaturkinetik der initialen DNA-Schäden gemessen im alkalischen Komet-Assay nach Bestrahlung mit ^{211}At für 4 Gy und 10 Gy. Der initiale DNA-Schaden (OTM) wurde auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (2 Spender, davon 1 Spender mit 2 Proben) mit dem Standardfehler für 3 Versuche.

Nach 20 h war eine Fortsetzung der Reparatur auf 44 % Restschaden nach 4 Gy ^{211}At zu vermerken. Für 10 Gy ^{211}At konnte eine geringfügige Schadensreduktion auf 50 % des Initialschadens bestimmt werden, sodass nach 20 h der Anteil unreparierter DNA-Schäden ein annähernd gleiches Niveau erreichte (Abb. 21). Einen Überblick über die DNA-Reparatur nach 20 h gibt die Übersicht in Tab. 15.

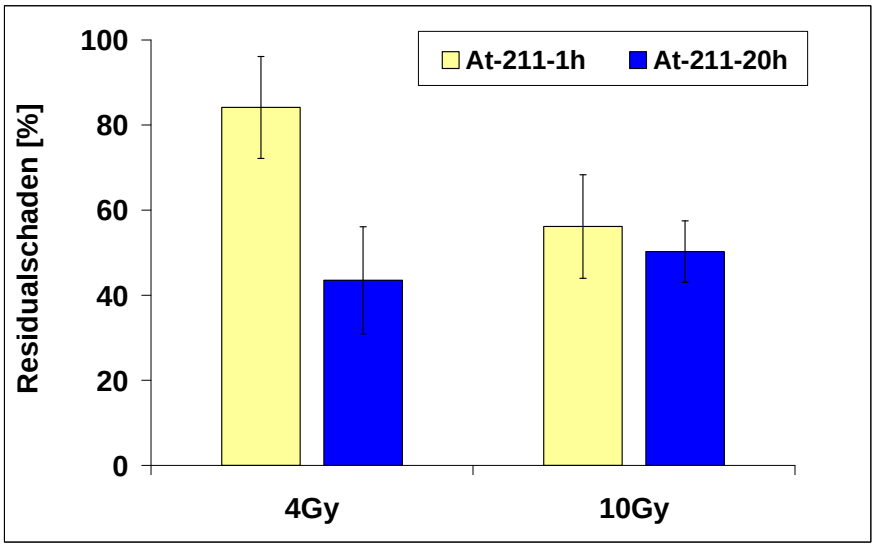

Abb. 21: Residualschäden nach Bestrahlung mit ^{211}At für 4 Gy und 10 Gy nach 1 h und 20 h Reparaturzeit im alkalischen Komet-Assay. Der initiale DNA-Schaden (OTM) wurde auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (2 Spender, davon 1 Spender mit 2 Proben) mit dem Standardfehler für 3 Versuche.

Hinsichtlich der apoptotischen Zellen bei der Kometen-Auswertung konnte eine Steigerung des Auftretens dieser Zellmorphologie mit steigender Dosis vermerkt werden, sowie ein weiterer Anstieg der Zellen mit Apoptosemerkmalen nach 20 h Reparaturinkubation.

^{188}Re

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Schadensreparatur nach Bestrahlung mit ^{211}At zeigte die Abb. 22 für ^{188}Re einen gegensätzlichen Kurvenverlauf. Vergleicht man das Reparaturvermögen nach 10 Gy so bleiben bei ^{211}At über die Hälfte (56 %) der Strangbrüche unrepariert und bei ^{188}Re hingegen nur 3 % (vgl. Abb. 22). Bereits 15 min nach Bestrahlung betrug der Restschaden der 2,5 Gy-Reihe nur noch ein Viertel des Initialschadens und der Wert für unbestrahlte Kontrollen wurde erreicht. Nach 2,5 Gy konnten die Zellen die DNA-Schäden mit der höchsten Geschwindigkeit eliminieren, der relative Restschaden nicht wiederverknüpfter DNA-Strangbrüche zeigte mit 13 % den höchsten Wert im Vergleich zu den Dosen von 5 Gy, 7,5 Gy und 10 Gy (3 %-6 %).

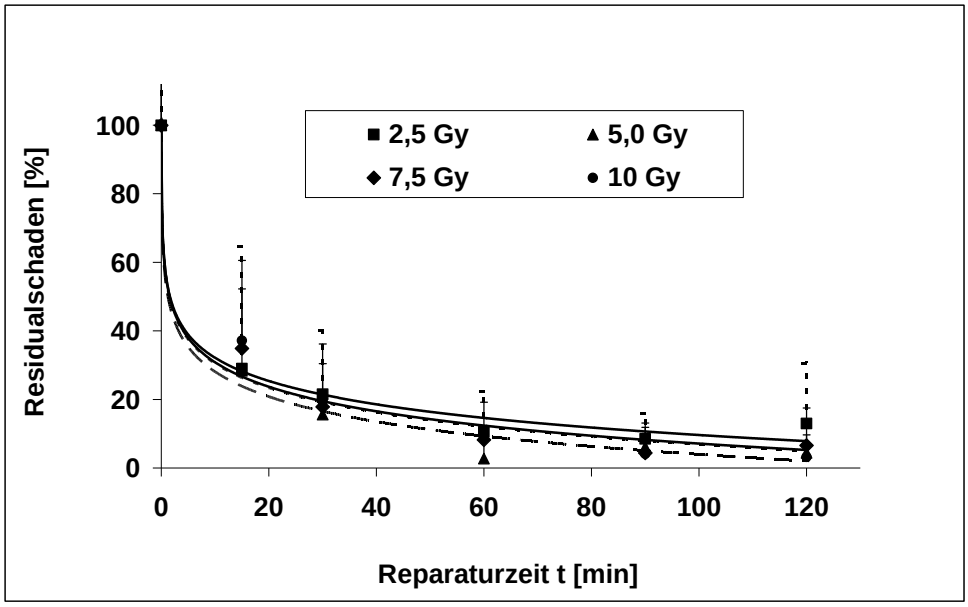

Abb. 22: Reparaturkinetik der initialen DNA-Schäden gemessen im alkalischen Komet-Assay nach Bestrahlung mit ^{188}Re für 2,5 Gy, 5,0 Gy und 7,5 Gy. Der initiale DNA-Schaden (OTM) wurde auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (2 Spender, davon 1 Spender mit 2 Proben) mit der gemittelten Standardabweichung der 3 Versuche.

Die Reparatur der durch ^{188}Re induzierten Einzelstrangbrüche war bei allen Dosen nach 60 min fast vollständig abgeschlossen. Die DNA-Schäden wurden bei kleinen Dosen wie z.B. 2,5 Gy und hohen Dosen beispielsweise 7,5 Gy und 10 Gy mit übereinstimmender Kinetik repariert. Die Reparaturhalbwertszeiten betrugen für 2,5 Gy=7,5 min, 5 Gy=10,5 min, 7,5 Gy=11,6 min und 10 Gy=11,9 min. Ab 5 Gy sind die Reparaturhalbwertszeiten nahezu

gleich und die Höhe der Schäden näherte sich nach 60 bis 120 min den Kontrollwerten an. Die Anzahl der bei Auswertung der Objektträger gezählten Apoptosen blieb bei den Punkten 2,5 Gy und 5 Gy unter dem Wert von 10 und bei 7,5 Gy und 10 Gy wurde ein leichter Anstieg auf 10-20 apoptotische Zellen registriert.

Doxorubicin

Die Reparatur der DNA-Schäden nach Inkubation der Lymphozyten mit Doxorubicin wurde über eine Stunde Reparaturinkubation mit drei Konzentrationen von Doxorubicin untersucht. Anders als bei den Radionukliden entstand der Initialschaden bei 37 °C (vgl. 3.1.1), die Zellreparatur wurde analog der Vorgehensweise bei ^{211}At und ^{188}Re ebenfalls bei 37 °C untersucht. Etwa die Hälfte der DNA-Schäden wurde innerhalb von 1 h beseitigt, wobei nach 30 min vorübergehend eine verstärkte Reduzierung der Schäden auf 26 % bzw. 40 % analysiert wurde. Die Höhe der Residualschäden zeigten keine Korrelationen mit den unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen. Nach Behandlung der Lymphozyten mit der niedrigsten Konzentration (6,8 µM) wurde eine geringere Reparaturkapazität (52 %) als mit der 2,5-fach höheren Konzentration (17 µM, 32 %) festgestellt.
Die starken Streuungen der Messwerte (OTM) ähnelten den Varianzen der Dosis-Wirkungs-Kurve (vgl. 3.1.3). Als mögliche Ursache kommt die Anwesenheit von geschädigten und ungeschädigten Zellen in der behandelten Zellpopulation in Frage.

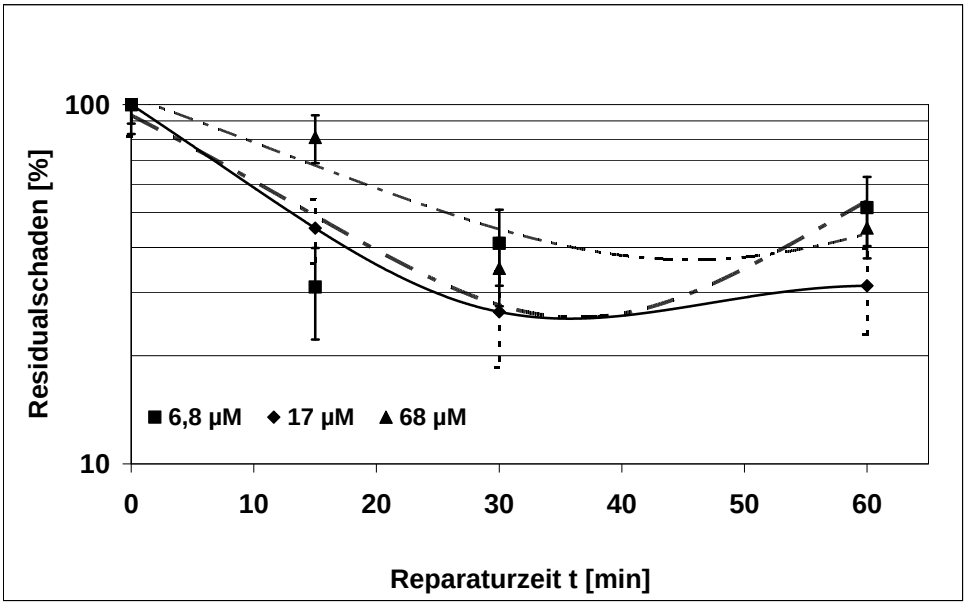

Abb. 23: Reparaturkinetik der initialen DNA-Schäden gemessen im alkalischen Komet-Assay nach Inkubation von Lymphozyten mit Doxorubicin der Konzentrationen 6,8 µM, 17 µM und 68 µM bei 37 °C. Der initiale DNA-Schaden (OTM) wurde auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen (2 Spender) mit dem Standardfehler.

Morphologisch auffällig war die Anwesenheit apoptotischer Zellen auf den zur Komet-Auswertung präparierten Objektträgern. Die Anzahl der als apoptotisch definierten Zellen korrelierten mit der Konzentration des Doxorubicins und der Reparaturzeit. So konnten semiquantitativ mehr als 100 Apoptosen während der Auswertung von 100 Zellen pro Objektträger erfasst werden (6,8 µM, 17 µM) und mehr als 200 apoptotische Zellen bei der Konzentration 68 µM.

In der folgenden Tabelle wurden die Ergebnisse des Reparaturverhaltens der Lymphozyten nach Exposition mit den DNA-schädigenden Noxen zusammengefasst (siehe Tab. 15).

Tab. 15: Übersicht der relativen Residualschäden im alkalischen Komet-Assay nach Exposition von Lymphozyten mit ^{211}At, ^{188}Re und Doxorubicin jeweils nach 1 h und 20 h Reparaturzeit. Die Initialschädigung wurde auf 100 % Residualschaden normiert. Gezeigt werden die Mittelwerte von 2-3 Versuchen und die gemittelte Standardabweichung.

Alkalischer Komet-Assay	Reparaturzeit t [h]			
	1h		20h	
	Residualschaden [%]	s	Residualschaden [%]	s
Astat-211				
4 Gy	84,2	119,7	43,5	126,0
10 Gy	56,2	121,7	50,3	72,2
Rhenium-188				
2,5 Gy	10,6	11,6		
5 Gy	2,7	7,4		
7,5 Gy	8,2	11,0		
10 Gy	10,0	11,2	nicht gemessen	
Doxorubicin				
6,8 µM	51,6	112,6		
17 µM	31,3	84,3		
68 µM	45,4	80,7	nicht gemessen	

3.2.2 Reparatur im neutralen Komet-Assay

^{211}At und ^{188}Re

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen an Lymphozyten wurde im neutralen Komet-Assay über einen Zeitraum von vier Stunden gemessen. Exemplarische Messungen des Restschadens nach 20 Stunden Erholungszeit wurden zusätzlich durchgeführt, die am Ende des Abschnitts in Tab. 16 präsentiert werden.
Die im Diagramm (Abb. 24 A) veranschaulichten Ergebnisse für ^{211}At weisen darauf hin, dass im untersuchten Zeitraum nur eine geringfügige Reparatur der DNA-Schäden erfolgte.

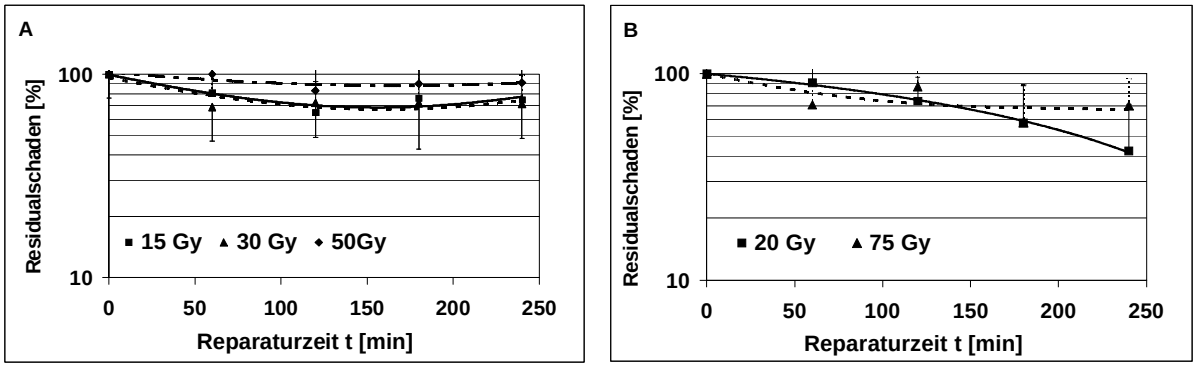

Abb. 24: A: Reparaturkinetik der initialen DNA-Schäden gemessen im neutralen Komet-Assay nach Bestrahlung mit ^{211}At für 15 Gy, 30 Gy und 50 Gy und B: mit^{188}Re für 20 Gy und 75 Gy. Der initiale DNA-Schaden (OTM) wurde auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (2 Spender, davon 1 Spender mit 2 Proben) mit der gemittelten Standardabweichung der 3 Versuche.

Nach 4 h wurden nach Bestrahlung mit 15 Gy und 30 Gy ^{211}At 75 % und 71 % verbliebene DNA-Doppelstrangbrüche gemessen, nach 50 Gy betrug der entsprechende Wert 91 %. Diese Daten ließen auf eine Korrelation der Bestrahlungsdosis mit der Höhe des verbliebenen DNA-Schadens schließen. Die Berechnung von Reparaturhalbwertszeiten war nicht möglich, da zu keinem Zeitpunkt eine Halbierung des Tail-Moments analysiert wurde. Bei Ausdehnung der Reparaturzeit auf 20 h konnte eine weitere Reparatur für 15 Gy auf 75 % der Residualschäden und für 50 Gy auf 75 % gefunden werden. Nach Exposition mit 30 Gy ^{211}At hingegen blieb der Restschadens auf dem Niveau der 4 h-Werte (vgl. Abb. 25).
Betrachtet man die Ergebnisse der Reparaturkinetk für die mit ^{188}Re bestrahlten Lymphozyten, wurde für 20 Gy nach 4 h zunächst eine Reduzierung des initialen Schadens auf 42 % Restschaden ermittelt (vgl. Abb. 24 B), der nach 20 h jedoch wieder auf 71 % anwuchs (vgl. Abb. 25). Aus dem Kurvenfit konnte eine Reparaturhalbwertszeit von 217 min berechnet werden. Die Werte der 20 h-Reparatur wiesen auf eine uneffiziente Wiederverknüpfung der DNA-Doppelstrangbrüche nach kurzer Reparaturzeit hin (vgl. Abb. 25).

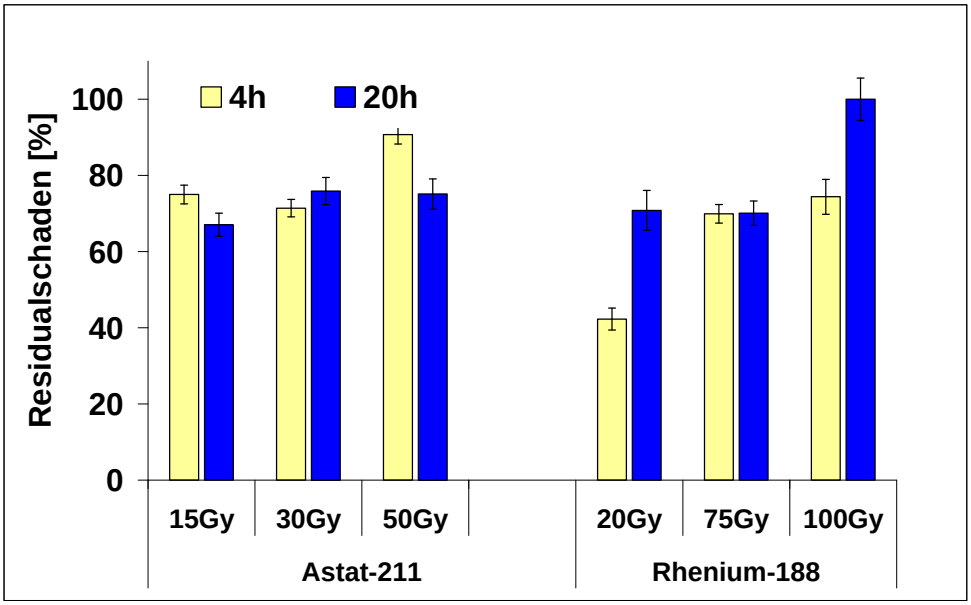

Abb. 25: Reparaturkinetik der initialen DNA-Schäden gemessen im neutralen Komet-Assay nach Bestrahlung von Lymphozyten mit ^{211}At für 15 Gy, 30 Gy und 50 Gy und ^{188}Re für 20 Gy, 75 Gy und 100 Gy. Der initiale DNA-Schaden (OTM) wurde auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Versuchen (2 Spender, davon 1 Spender mit 2 Proben) mit der gemittelten Standardabweichung der 3 Versuche.

Doxorubicin

Die Reparatur der DNA-Schäden nach Inkubation der Lymphozyten mit Doxorubicin wurde im neutralen Assay über 4 h Reparaturinkubation bei 37 °C verfolgt. Die Doxorubicin-Konzentrationen entsprachen den Konzentrationen, die im alkalischen Komet-Assay verwendet wurden.

Eine nachweisbare Inhibierung der DNA-Reparatur durch Inkubation der Lymphozyten mit 68 µM, 17 µM und 6,8 µM Doxorubicin resultierte in 50 %, 75 % und 82 % residuellen DNA-Schäden nach 4 h Reparaturzeit. Die Ergebnisse demonstrierten wie bei den Versuchen mit dem alkalischen Komet-Protokoll eine inverse Korrelation zur Doxorubicin-Konzentration, wobei sich der geringste Restschaden nach 68 µM deutlich vom Restschaden der niedrigeren Konzentrationen unterschied.

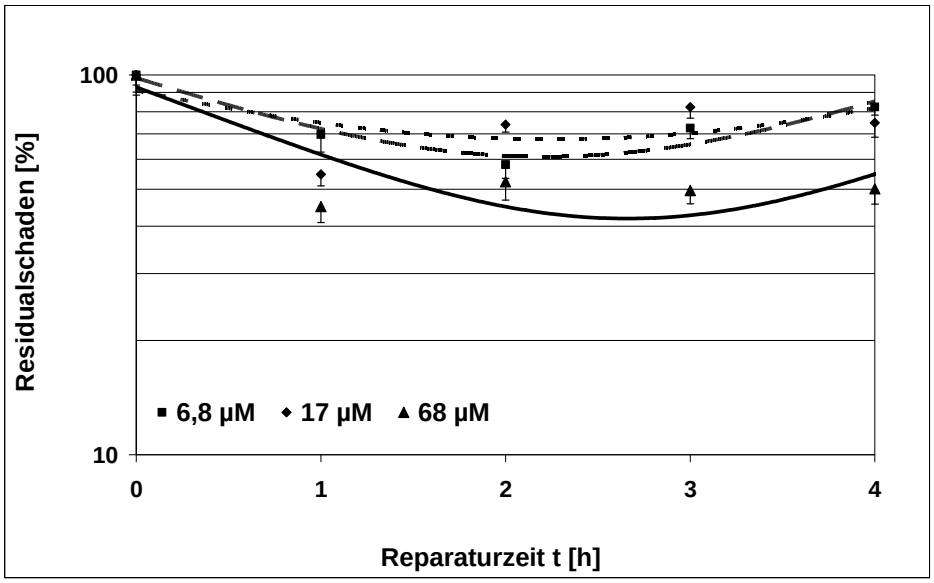

Abb. 26: Reparaturkinetik der initialen DNA-Schäden gemessen im neutralen Komet-Assay nach Inkubation von Lymphozyten mit Doxorubicin der Konzentrationen 6,8 µM, 17 µM und 68 µM bei 37 °C. Der initiale DNA-Schaden (OTM) wurde auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen (2 Spender) mit dem Standardfehler.

Betrachtet man die Ergebnisse nach 20 h Reparaturzeit, konnte einerseits eine weitere Reparatur bei den Konzentrationen 17 µM und 6,8 µM von 75 % auf 45 % bzw. von 82 % auf 59 % festgestellt werden. Andererseits stellte sich ein nahezu einheitlicher Residualschaden für alle Konzentrationen ein (vgl. Tab. 16). Eine ausführliche Interpretation dieser Ergebnisse ist im Abschnitt 4.3.3 zu finden.

Noch stärker ausgeprägt als bei Schädigung der Lymphozyten mit ^{211}At konnte bei Behandlung mit Doxorubicin nach 1 h ein streng konzentrationsabhängiger (6,8 µM-68 µM) Anstieg der auf den Objektträgern als apoptotisch identifizierten Zellen (2, 20, >100) registriert werden. Nach langer Reparaturzeit von 20 h stieg die Anzahl apoptotischer Zellen deutlich an (36>100>200).

In der Tabelle 16 wurden die Ergebnisse des Reparaturverhaltens der Lymphozyten im neutralen Komet-Assay nach Exposition mit den DNA-schädigenden Noxen zusammengefasst.

Tab. 16: Übersicht der relativen Residualschäden im neutralen Komet-Assay nach Exposition von Lymphozyten mit ^{211}At, ^{188}Re und Doxorubicin jeweils nach 1 h und 20 h Reparaturzeit. Die Initialschädigung wurde auf 100 % Residualschaden normiert. Gezeigt werden die Mittelwerte von 2-3 Versuchen und die gemittelte Standardabweichung.

Neutraler Komet-Assay	Reparaturzeit t [h]			
	4h		20h	
	Residualschaden [%]	s	Residualschaden [%]	s
Astat-211				
15 Gy	75,0	24,3	67,0	30,5
30 Gy	71,4	23,0	75,9	35,7
50Gy	90,8	25,0	75,1	39,5
Rhenium-188				
20 Gy	42,3	28,9	70,8	52,4
75 Gy	69,9	24,4	70,1	31,9
100 Gy	74	45,7	107,2	55,8
Doxorubicin				
6,8 µM	82,4	28,1	59,6	60,8
17 µM	74,8	44,1	45,1	39,8
68 µM	50,1	31,3	62,8	61,0

3.2.3 Vergleichende Betrachtungen

Im alkalischen Komet-Assay bestand ein signifikanter Unterschied im Reparaturverhalten der Zellen nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re. Die DNA-Strangbruchreparatur nach Schädigung mit dem ^{188}Re-Emitter erfolgte nach kurzen Reparaturhalbwertszeiten mit hoher Effizienz. Bei ^{211}At hingegen wurde nach 1 h ein anhaltend hohes Restschadenniveau bestimmt, wobei eine weitere Schadenbeseitigung nach 20 h beobachtet wurde. Doxorubicin und ^{211}At verursachten eine deutliche Inhibierung der DNA-Reparatur im Vergleich zu ^{188}Re.

Mit dem neutralen Komet-Assay konnte nach 4 h Erholungszeit eine verminderte Doppelstrangbruchreparatur nach Schädigung mit ^{211}At im Vergleich zu ^{188}Re gezeigt werden.

Nach der Reparaturzeit von 20 h bestanden bei der Analyse mit dem neutralen Komet-Assay nur geringe Unterschiede im Reparaturvermögen nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re.

Bei höheren Bestrahlungsdosen war nachzuweisen, dass 30 Gy ^{211}At die gleiche biologische Wirkung wie 75 Gy ^{188}Re induzieren konnte (70 % Restschaden). Die Kalkulation des Isoeffekts (gleiche Wirkung bei unterschiedlichen Dosen) ergab eine um den Faktor 2,5 höhere biologische Wirkung für ^{211}At.

Die Dosis von 50 Gy ^{211}At hinterließ einen relativen Anteil residualer DSB in Höhe von 91 % und zeigte somit eine höhere Wirkung als 75 Gy ^{188}Re.

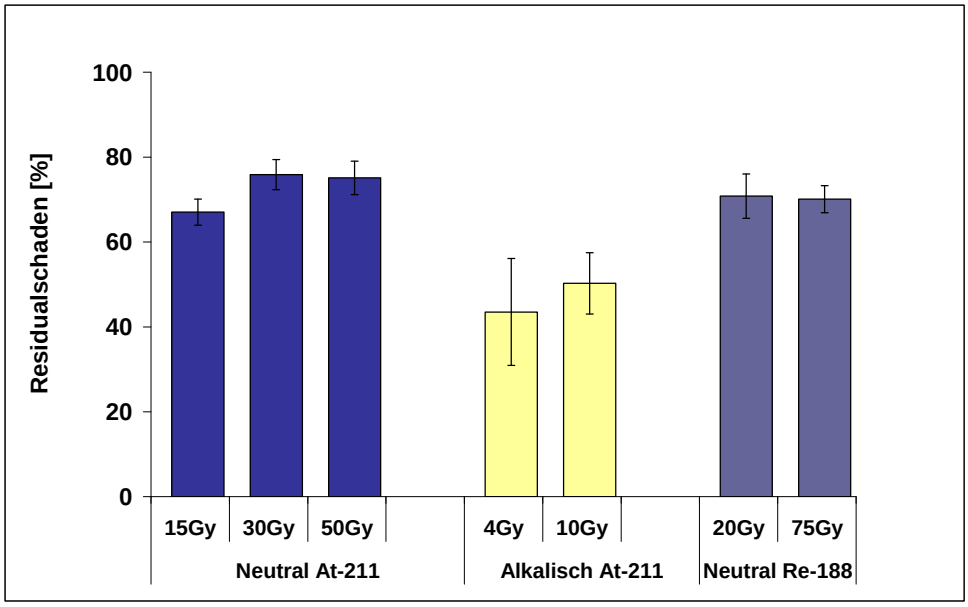

Abb. 27: Reparaturkinetik der initialen DNA-Schäden nach 20 h, gemessen im alkalischen und neutralen Komet-Assay nach Bestrahlung mit ^{211}At für 4 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 30 Gy und 50 Gy sowie ^{188}Re für 20 Gy und 75 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (3 Spender) mit dem Standardfehler der 3 Versuche.

In der Abb. 27 wurden die Ergebnisse der Reparaturinhibierung nach 20 h Reparaturzeit für ^{211}At und ^{188}Re jeweils für den alkalischen und neutralen Komet-Assay zusammenfassend dargestellt.

Anhand vergleichender Betrachtungen der DNA-Strangbruchreparatur nach Schädigung mit Doxorubicin zwischen den Ergebnissen der beiden Komet-Assay-Varianten konnte eine stärkere Hemmung der DNA-Reparatur im neutralen Assay gemessen werden.

Hinsichtlich des Vergleichs der Reparaturkapazität der Lymphozyten nach Exposition mit den untersuchten DNA-schädigenden Agenzien kann zusammenfassend festgestellt werden, dass im alkalischen Komet-Assay nach Schädigung mit ^{211}At die geringste Reparatur-inhibierung gefunden wurde.

Im neutralen Assay musste eine Unterscheidung zwischen Kurz- und Langzeitreparatur erfolgen. Während nach 4 h Reparaturzeit für die ^{211}At-Kurve bei vergleichbaren Dosen höhere Restschäden als nach ^{188}Re blieben, konnten nach 20 h Reparaturzeit sowohl für die Radionuklide als auch für Doxorubicin Residualschäden auf einem übereinstimmend hohem Niveau (60 %-70 %) verzeichnet werden.

3.3 Detektion von Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur mit der Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur wurde die Methode der γ-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) mit der Darstellung nukleärer Foci herangezogen, die als Folge der induzierten Doppelstrangbrüche entstehen. Es sollte für beide Strahlenqualitäten und Doxorubicin die Abhängigkeit der Entstehung von γ-H2AX-Foci von der Dosis sowie die Kinetik der DSB-Reparatur untersucht werden.
Die durchgeführten Vorversuche dienten zur Ermittlung der optimalen Dosisbereiche sowie zur Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK). Untersuchungen zur Reparaturkinetik der induzierten DSB erfolgten im Zeitfenster von 10 min-24 h. Für jede DNA-schädigende Noxe wurden verschiedene Spender verwendet.

3.3.1 Messung von DSB und deren Reparatur nach Bestrahlung mit ^{211}At

Um die DSB-induzierende Wirkung von ^{211}At zu untersuchen, wurde zunächst ein Dosisbereich bis zu 2 Gy ausgewählt. Es zeigte sich, dass bei Bestrahlung mit 2 Gy die Anzahl der Foci pro Zellkern so hoch war, dass die optische Auflösung des Einzelfokus nicht mehr gegeben war. Durch die massive DNA-Schädigung sowie den für Hoch-LET-Emitter typischen Effekt der kurzen Schädigungsspuren lagen die γ-H2AX-Foci zu dicht neben- bzw. übereinander. Zudem wurde festgestellt, dass in den mononukleären Blutzellen etwa 30 Foci/Zellkern zählbar waren, eine höhere Anzahl führte zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen.

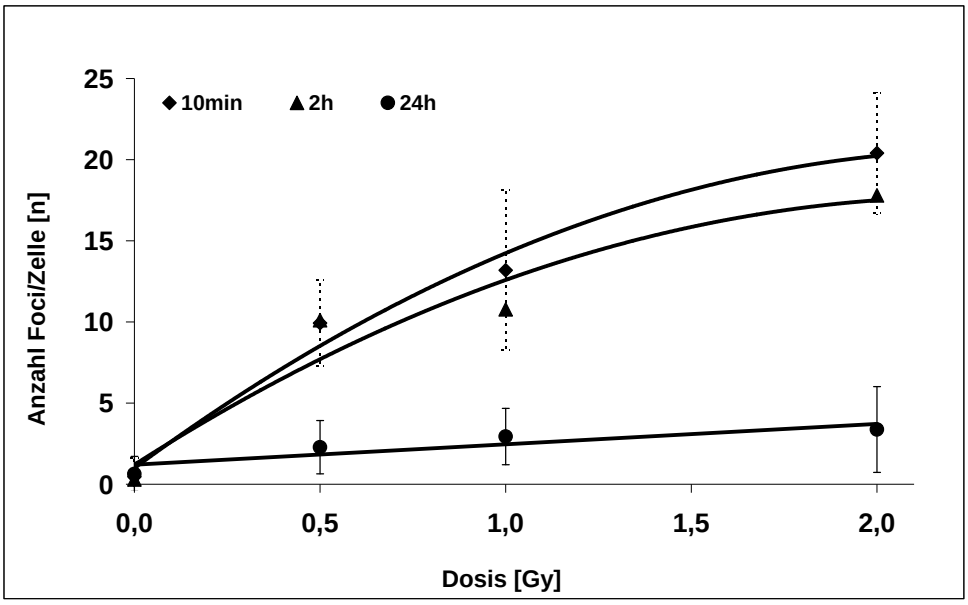

Abb. 28: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Lymphozyten nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, 1,0 Gy und 2,0 Gy ^{211}At nach 10 min, 2 h und 24 h Reparaturzeit bei 37 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte von 100 Zellen eines Versuches mit der Standardabweichung.

Die Versuche mit ^{211}At wurden aus diesen Gründen im linearen Teil der DWK bis 1,0 Gy durchgeführt, da bei höheren Dosen eine Sättigung eintrat. Dieser Sättigungseffekt wurde bei den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung gleichermaßen gefunden (vgl. Abb. 28).
Der deutliche Anstieg der induzierten γ-H2AX-Foci bis 0,5 Gy ließ eine dosisabhängige Detektion der Foci auch bei wesentlich kleineren Dosen als 0,5 Gy vermuten. Die Experimente wurden daraufhin im Dosisbereich von 0,05 Gy bis 1 Gy durchgeführt und Reparaturzeiten von 10 min, 2 h sowie 24 h untersucht. Im Bereich bis 1 Gy konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen der Dosis und der Anzahl der Foci definiert werden. Die Anstiege der linearen Kurvenanpassung für die Geradengleichung betrugen nach 10 min: y=12,1x+2,2; nach 2 h: y=8,9x+3,4 und nach 24 h: y=2,05x+1,1. In Relation zum Zeitfenster nach Bestrahlungsende wurde ein unterschiedlicher Kurvenanstieg gefunden, wobei die 10 min-Kurve den steilsten Anstieg aufwies.

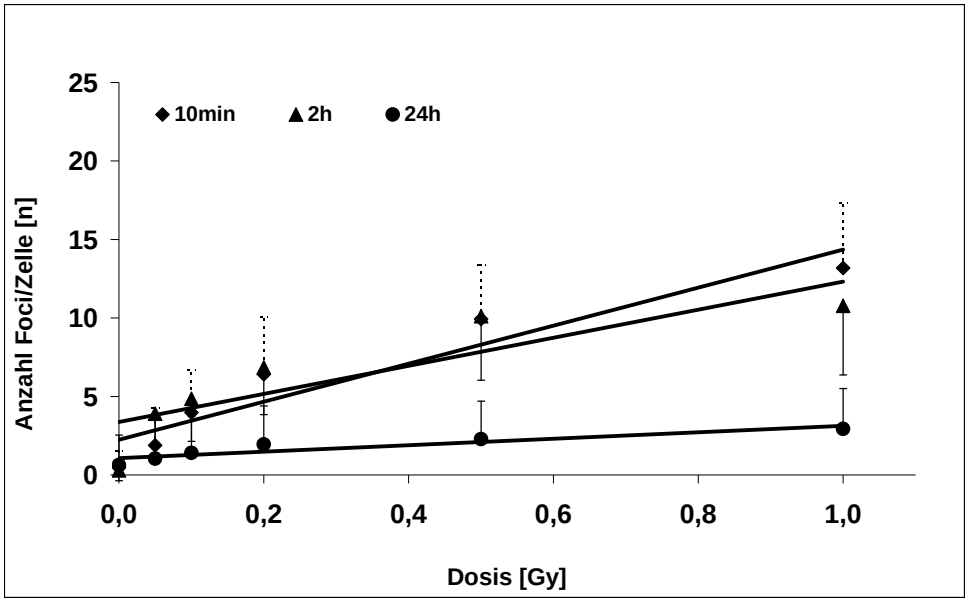

Abb. 29: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Lymphozyten nach Bestrahlung mit 0,05 Gy, 0,1 Gy, 0,2 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy ^{211}At nach 10 min, 2 h und 24 h Reparaturzeit bei 37 °C. Gezeigt werden die Mittelwerte aus 4 Versuchen mit 4 Spendern und die gemittelte Standardabweichung.

Bereits 10 min nach Bestrahlungsende wurden bei den Dosen von 0,5 Gy und 1 Gy die größte Anzahl induzierter Foci gezählt und bis 1 Gy noch eine deutliche Erhöhung der Focianzahl im Vergleich zu 0,5 Gy registriert. Die Phosphorylierung infolge der DSB-Induktion folgte damit einer schnellen Kinetik. Hinsichtlich der absoluten Anzahl der γ-H2AX-Foci lag diese nur bei 1 Gy über der vergleichbaren Anzahl der 2 h-Kurve (13,2/10,8). Im Unterschied dazu konnte 2 h nach Bestrahlung zwischen 0,5 Gy und 1 Gy eine geringere

Steigerung der gezählten Foci vermerkt werden. Im Dosisbereich <0,5 Gy dagegen lag die absolute Anzahl der γ-H2AX-Foci über den 10 min-Werten (vgl. Abb. 29).

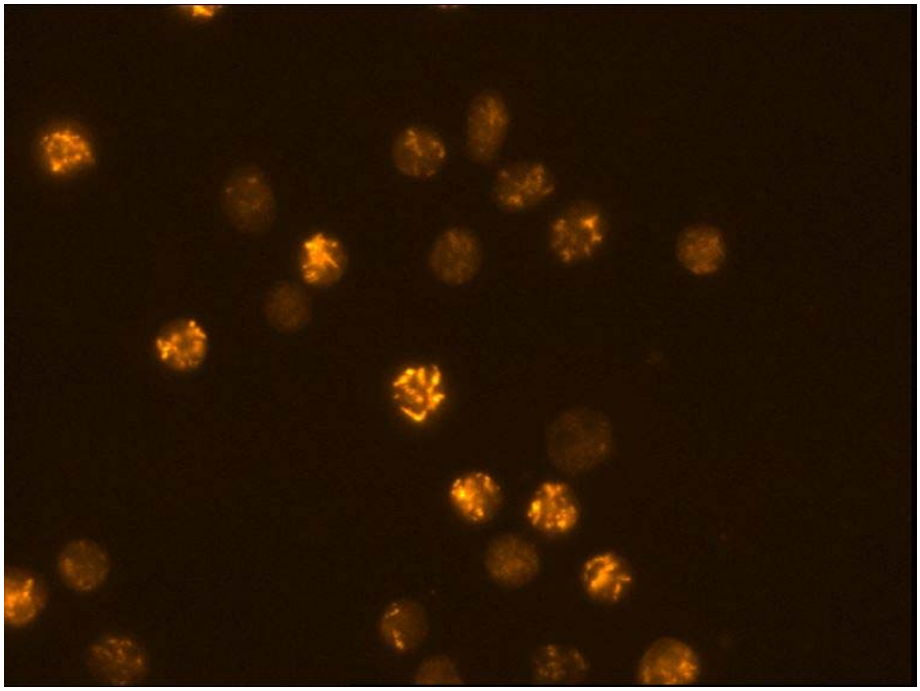

Abb. 30: γ-H2AX-Foci für Lymphozyten nach Bestrahlung mit 1 Gy ^{211}At und nach 2 h Reparaturzeit, Vergrößerung 100x

Morphologisch erschienen die Foci in großer Anzahl, wobei der einzelne Focus kleiner war im Vergleich zu den Foci nach 2 h und 24 h Reparaturzeit. Bei den letztgenannten Zeiten fielen stark leuchtende Zellen auf und Zellen mit 2-3-fach größeren Einzelfoci. In der DAPI-Färbung wurden Zellkerne mit Anzeichen von Apoptosemerkmalen gefunden.
Bei Betrachtung der Verteilung der Foci im Zellkern wiesen diese die für Hoch-LET-Emitter typischen Schädigungsspuren als Tracks auf (vgl. Abb. 30). Eine optische Auflösung der Einzelfoci war ab der Dosis von 2 Gy nicht mehr möglich, was eine lokale Konzentration der Doppelstrangbrüche schließen ließ.

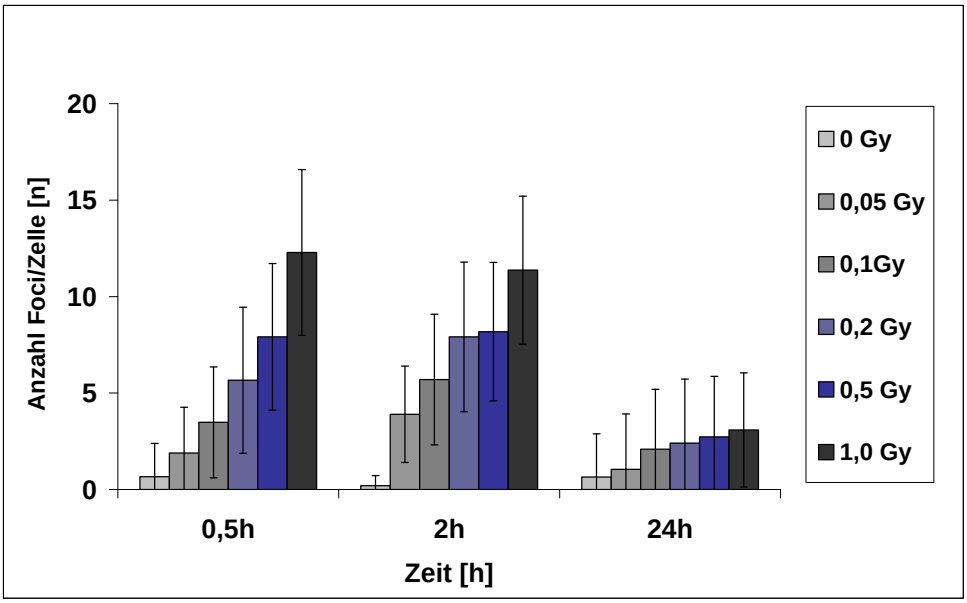

Abb. 31: Darstellung der induzierten Doppelstrangbrüche und der Reparaturkinetik für Lymphozyten nach Bestrahlung mit ^{211}At in Abhängigkeit von der Dosis. Gezeigt werden die Mittelwerte von 4 Versuchen und die gemittelte Standardabweichung

Das Diagramm (Abb. 31) veranschaulicht einerseits die Dosis-Effekt-Beziehung für die Induktion von γ-H2AX-Foci, zum anderen wird die Reparatur der DSB (Dephosphorylierung am Histon H2AX) verdeutlicht. Nach 24 Stunden wurden die nukleären Foci bis auf einen Restschaden repariert, dessen Ausmaß mit der Dosis korrelierte. Die relativen Residualschäden unreparierter DSB sind in Abschnitt 3.4.4 im Vergleich mit den Ergebnissen für ^{188}Re dargestellt.

Hervorzuheben ist die Sensitivität der Methode im Niedrig-Dosis-Bereich, da bereits ab 0,05 Gy eine signifikante Erhöhung der γ-H2AX-Foci im Vergleich zur Kontrolle gezählt wurde (T-Test). Dies galt für die Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach 10 min ($p<0,001$) und 2 h ($p<0,001$). Nach der Reparaturzeit von 24 h konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen 0 Gy und 0,05 Gy festgestellt werden ($p=0,18$), siehe Tab. 17.

Tab. 17: Wertetabelle mit der Anzahl der Foci/Zelle für ^{211}At in Abhängigkeit von der Dosis und der Reparaturzeit, Mittelwert aus 4 Experimenten und gemittelte Standardabweichung

Dosis [Gy]	0,0	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0
Foci/Zelle [n]-10min	0,47	1,89	3,98	6,42	9,93	13,18
s	1,05	2,37	2,72	3,64	3,44	4,15
Foci/Zelle [n]-2h	0,30	3,90	4,85	6,85	10,11	10,78
s	0,67	2,50	2,71	3,01	4,07	4,41
Foci/Zelle [n]-24h	0,63	1,04	1,41	1,94	2,28	2,94
s	1,91	2,87	2,34	2,46	2,41	2,57

3.3.2 Messung von DSB und deren Reparatur nach Bestrahlung mit ^{188}Re

Um die Wirkung von ^{188}Re als Beta-Strahler hinsichtlich der Fähigkeit zur Induktion von Doppelstrangbrüchen zu untersuchen, wurden wie bei der Exposition mit ^{211}At Vorversuche zur Ermittlung des optimalen Dosisbereiches durchgeführt. Die Kurvenverläufe zeigten wie beim Alpha-Strahler einen Sättigungseffekt der biologischen Wirkung bei höheren Dosen.

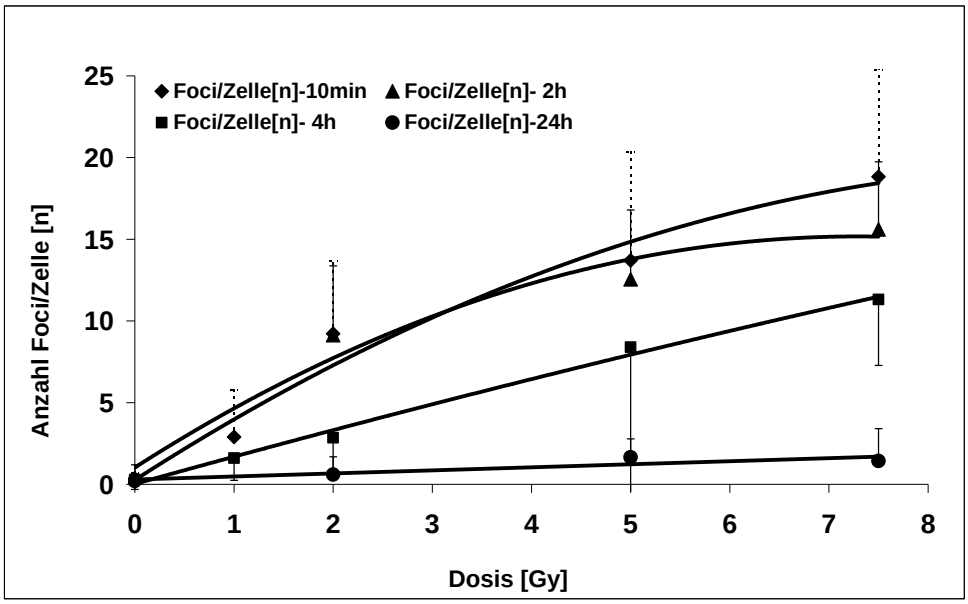

Abb. 32: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Lymphozyten nach Bestrahlung mit 1 Gy, 2 Gy, 5 Gy und 7,5 Gy ^{188}Re nach 10 min, 2 h, 4 h und 24 h Reparaturzeit bei 37°C. Dargestellt sind die Mittelwerte von 100 Zellen eines Versuches mit der Standardabweichung.

Ab einer Dosis von 5 Gy wurde ein Sättigungseffekt der DSB-Induktion gefunden, der bei der Reparaturzeit von 2 Stunden besonders deutlich ausgeprägt war. Bis zur Dosis von 2 Gy war ein deutlicher Anstieg der gezählten γ-H2AX-Foci zu erkennen (vgl. Abb. 32). Der Dosisbereich für die Versuche mit ^{188}Re wurde im unteren Bereich auf 0,5 Gy erweitert und die obere Grenze auf 5 Gy festgelegt. Die Ergebnisse waren daraufhin als lineare Dosis-Wirkungs-Kurven darstellbar (vgl. Abb. 33).

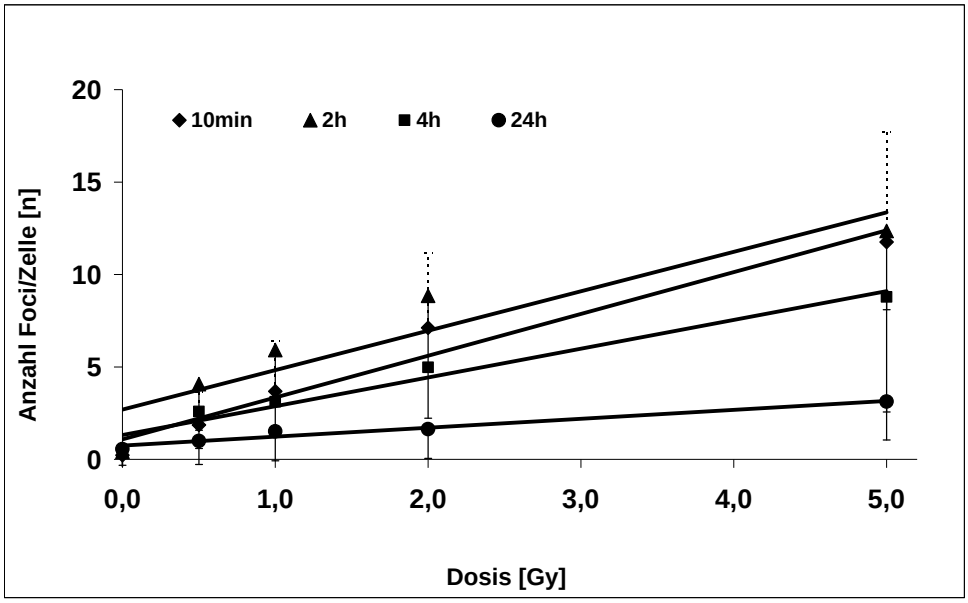

Abb. 33: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Lymphozyten nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy ^{188}Re nach 10 min, 2 h, 4 h und 24 h Reparaturzeit bei 37 °C. Gezeigt werden die Mittelwerte aus 3 Versuchen mit 3 Spendern und die gemitttelte Standardabweichung.

Bei Betrachtung der Anzahl der γ-H2AX-Foci pro Zellkern der 10 min-Kurve im Vergleich zur Abhängigkeit nach 2 h, konnten bei allen Dosispunkten nach 2 h höhere Werte gemessen werden. Die Geradengleichungen des linearen Kurvenfits demonstrieren ähnliche Anstiege mit: y=2,26x+1,1 für 10 min und mit y=2,13x+2,7 für 2 h. Im Unterschied zu diesen Ergebnissen wurde bei den Experimenten mit ^{211}At eine markante Diskrepanz zwischen den Anstiegen der 10 min-Kurve und 2 h-Kurve und damit der Kinetik der DSB-Induktion gefunden (vgl. 3.4.1).

Das folgende Diagramm (vgl. Abb. 34) präsentiert zum einen die Dosisabhängigkeit der Ausbildung von nukleären Foci infolge der Entstehung von DSB sowie die Reparatur der Doppelstrangbrüche (Dephosphorylierung).

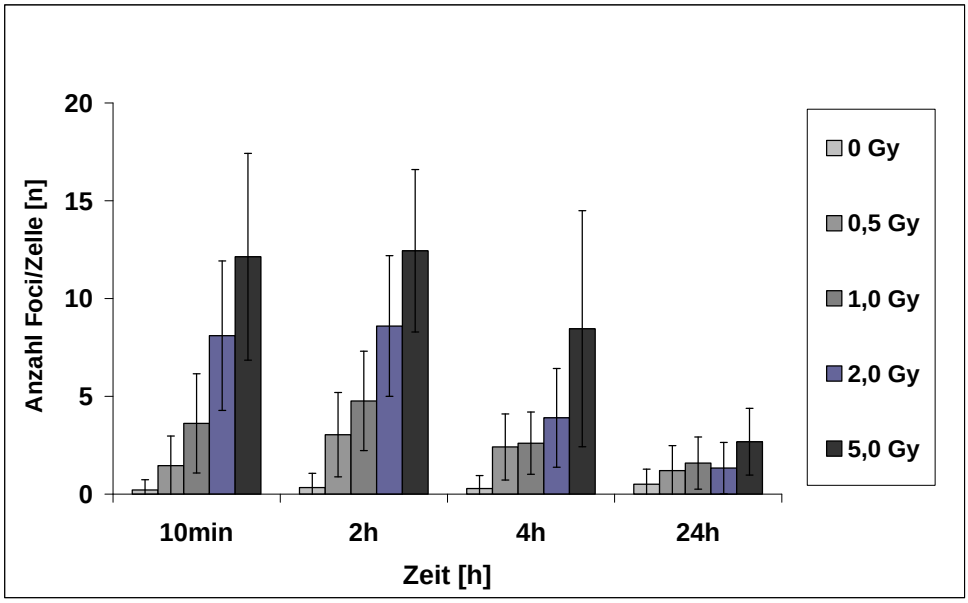

Abb. 34: Darstellung der induzierten Doppelstrangbrüche und der Reparaturkinetik für Lymphozyten nach Bestrahlung mit ^{188}Re in Abhängigkeit von der Dosis. Gezeigt werden die Mittelwerte aus 3 Versuchen mit 3 Spendern und die gemittelte Standardabweichung.

Nach 2 Stunden Reparaturzeit war bei allen Dosispunkten noch keine Abnahme der Anzahl der γ-H2AX-Foci zu erkennen, sondern ein geringer Anstieg der Anzahl der Foci pro Zellkern. Ein Reparatureffekt konnte 4 h Stunden nach Bestrahlung nachgewiesen werden, der sich bis 24 h auf ein dosisabhängiges Restschadenniveau fortsetzte.

Die relativen Restschäden (DSB) sind in den Diagrammen Abb. 39 und Abb. 40 im Vergleich mit den Ergebnissen für ^{188}Re dargestellt.

Die Sensitivität der Methode wurde im Niedrig-Dosis-Bereich getestet, bereits ab 0,5 Gy konnte eine signifikante Erhöhung der γ-H2AX-Foci im Vergleich zur Kontrolle gezählt werden (T-Test, 95 % Signifikanzniveau). Dies galt für die Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach 10 min ($p<0,001$), 2 h ($p<0,001$) und für die 4 h-Reihe ($p<0,001$). Nach der Reparaturzeit von 24 h konnten, wie bei den Ergebnissen für ^{211}At, keine signifikanten Unterschiede zwischen 0 Gy und 0,5 Gy festgestellt werden ($p=0,39$).

Tab. 18: Wertetabelle mit der Anzahl der Foci/Zelle für ^{188}Re in Abhängigkeit von der Dosis und der Reparaturzeit, Mittelwert aus 3 Experimenten mit 3 Spendern und gemittelte Standardabweichung

Dosis [Gy]	0,0	0,50	1,0	2,0	5,0
Foci/Zelle [n]-10min	0,23	1,86	3,68	7,11	11,76
s	0,54	1,77	2,70	4,06	5,96
Foci/Zelle [n]-2h	0,41	4,07	5,91	8,85	12,36
s	0,82	2,49	2,80	3,63	4,27
Foci/Zelle[n]-4h	0,34	2,59	3,11	4,98	8,78
s	0,66	1,99	1,75	2,75	6,23
Foci/Zelle [n]-24h	0,55	1,00	1,52	1,64	3,13
s	0,98	1,27	1,59	1,58	2,08

Die nach Bestrahlung mit ^{188}Re induzierten Foci waren gleichmäßig im Zellkern verteilt und der Einzelfocus kleiner als der einzelne Focus nach Bestrahlung mit ^{211}At (vgl. Abb. 35).

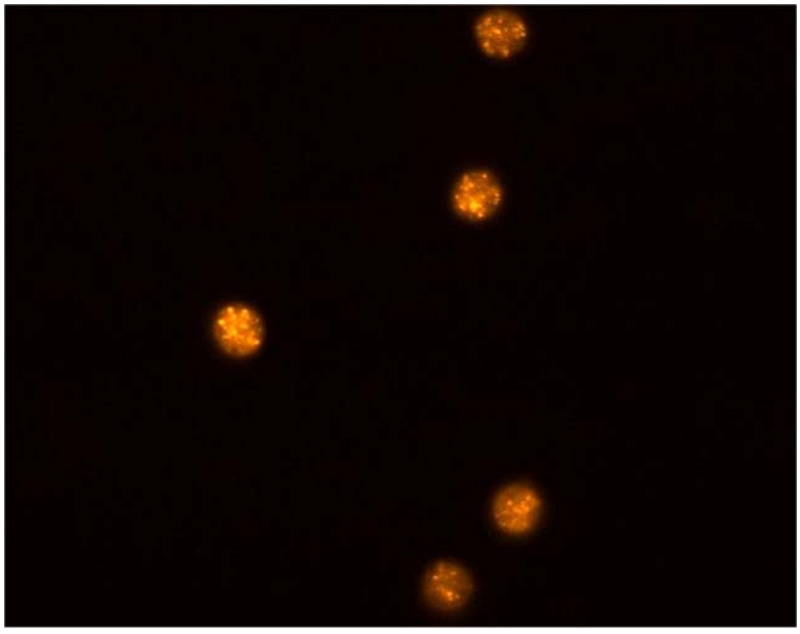

Abb. 35: γ-H2AX-Foci für Lymphozyten nach Bestrahlung mit 5 Gy ^{188}Re nach 2 h Reparaturzeit, Vergrößerung 100x

Wie bei der Schädigung der Lymphozyten mit ^{211}At war eine optische Auflösung der Einzelfoci ab einer Dosis von 7,5 Gy ^{188}Re nicht mehr möglich, da die Foci in geringer räumlicher Entfernung lagen.

3.3.3 Bestimmung von DSB und deren Reparatur nach Inkubation mit Doxorubicin

Die Detektion der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin wurde durch Inkubation der Lymphozyten mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 µg/ml-40 µg/ml; 6,8 µM-68 µM) durchgeführt.

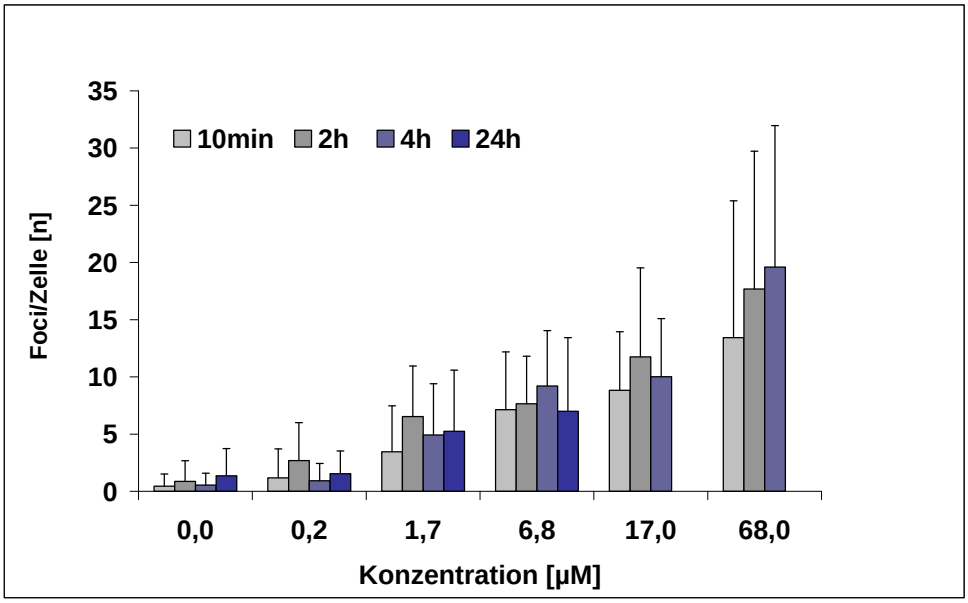

Abb. 36: Darstellung der induzierten Doppelstrangbrüche und der Reparaturkinetik für Lymphozyten in Abhängigkeit von der Doxorubicin-Konzentration. Gezeigt werden die Mittelwerte aus 120-150 Zellen eines exemplarischen Versuchs und die Standardabweichung.

Eine Abhängigkeit der Bildung der γ-H2AX-Foci von der Konzentration zeigt die Abb. 36. Kurz nach Inkubationsende (10 min) wurden die geringste Anzahl Foci/Zelle gezählt. Die Kinetik der Ausbildung der γ-H2AX-Foci zeigte eine Abhängigkeit von der Doxorubicin-Konzentration. Bei den Konzentrationen von 0,17 µM und 1,7 µM wurde jeweils nach 2 h die maximale Foci-Anzahl analysiert. Betrachtet man die Ergebnisse bei höheren Konzentrationen (6,8 µM, 68 µM) so zeigte sich, dass die Bildung der γ-H2AX-Foci noch andauerte (vgl. Abb. 37).

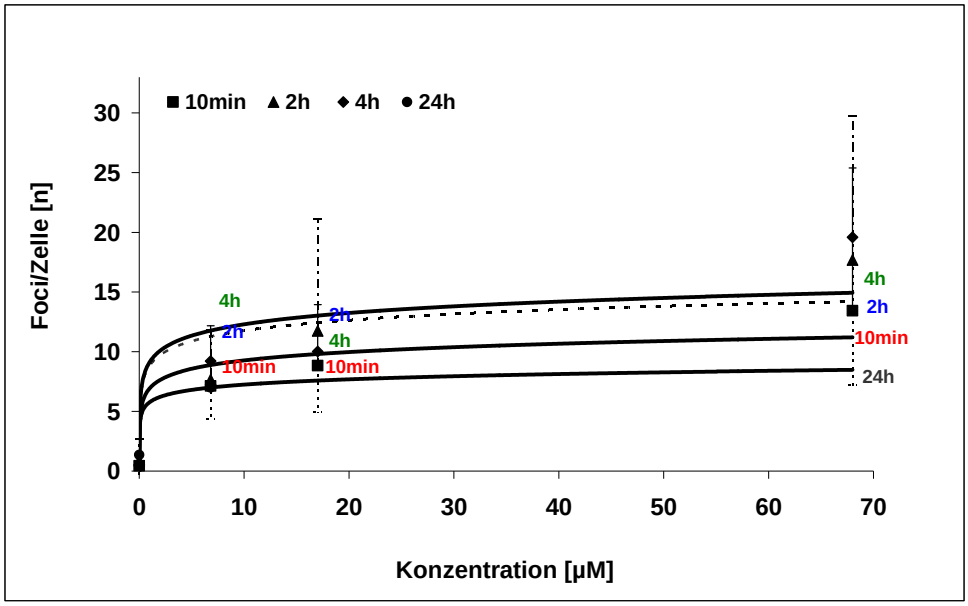

Abb. 37: Darstellung der induzierten Doppelstrangbrüche und der Reparaturkinetik für Lymphozyten in Abhängigkeit von der Doxorubicin-Konzentration. Gezeigt werden die Mittelwerte aus 120-150 Zellen eines exemplarischen Versuchs und die Standardabweichung.

Nach der Reparaturzeit von 24 h konnten für die beiden höchsten Konzentrationen die Foci nicht bestimmt werden, da keine Einzelfoci erkennbar waren, sondern einheitlich gefärbte Kerne mit starker Fluoreszenzintensität. Dieser Sättigungseffekt beruht vermutlich auf der Induktion von Apoptose nach entsprechend hohen Doxorubicin-Konzentrationen.

Der Anteil unreparierter DSB betrug nach 24 h für die Konzentrationen 0,17 µM; 1,7 µM und 6,8 µM bezogen auf die maximale Anzahl γ-H2AX-Foci 49 %, 79 % und 75 % (Tab. 19).

Die Kinetik der DSB-Induktion unterschied sich vor allem von der Kinetik der ^{211}At-Versuchsreihe durch eine vergleichsweise verzögerte Phosphorylierung infolge der DNA-Doppelstrangbruch-Induktion.

Tab. 19: Wertetabelle mit der Anzahl der Foci/Zelle für Doxorubicin in Abhängigkeit von der Konzentration und der Reparaturzeit. Gezeigt werden die Mittelwerte aus 120-150 Zellen eines Experiments und die Standardabweichung.

Konzentration [µM]	10min	2h	4h	24h
0,0	0,44	0,87	0,54	1,36
s	1,07	1,80	1,04	2,37
0,17	1,17	2,69	0,92	1,54
s	2,53	3,31	1,51	1,98
1,7	3,45	6,54	4,93	5,24
s	4,02	4,42	4,47	5,35
6,8	7,14	7,65	9,21	7,00
s	5,04	4,16	4,83	6,43
17,0	8,82	17,58	8,66	nicht auswertbar
s	5,13	9,37	5,08	
68,0	13,43	14,67	19,59	nicht auswertbar
s	11,96	12,05	12,38	

Beim Auswerten der Zellen am Fluoreszenzmikroskop fiel eine starke Heterogenität der Schäden innerhalb der Lymphozytenpopulation auf. Entsprechend des Ausmaßes des Schadens konnten die Zellen in 3 Gruppen eingeteilt werden: (1) Zellen mit einer bestimmten Anzahl zählbarer Foci und morphologisch intakt (2) Zellen ohne Foci (oder optisch nicht auflösbar) und (3) morphologisch stark geschädigte Zellen, die von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

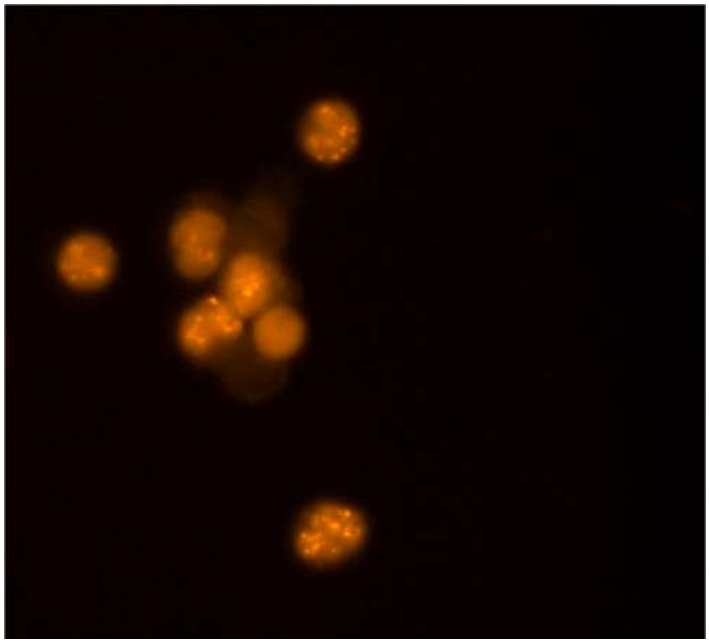

Abb. 38: γ-H2AX-Foci für Lymphozyten nach Inkubation mit 6,8 µM Doxorubicin nach 2 h Reparaturzeit, Vergrößerung 100x

3.3.4 Vergleichende Betrachtungen

Einen Vergleich der Doppelstrangbruch-Induktion nach 10 min für ^{211}At und ^{188}Re mit den Dosispunkten von 0,5 Gy und 1 Gy zeigt die Abb. 39. Die Anstiege der linearen Kurvenanpassungen verdeutlichen die schnelle Kinetik der γ-H2AX-Foci-Induktion nach Bestrahlung der Lymphozyten mit ^{211}At.

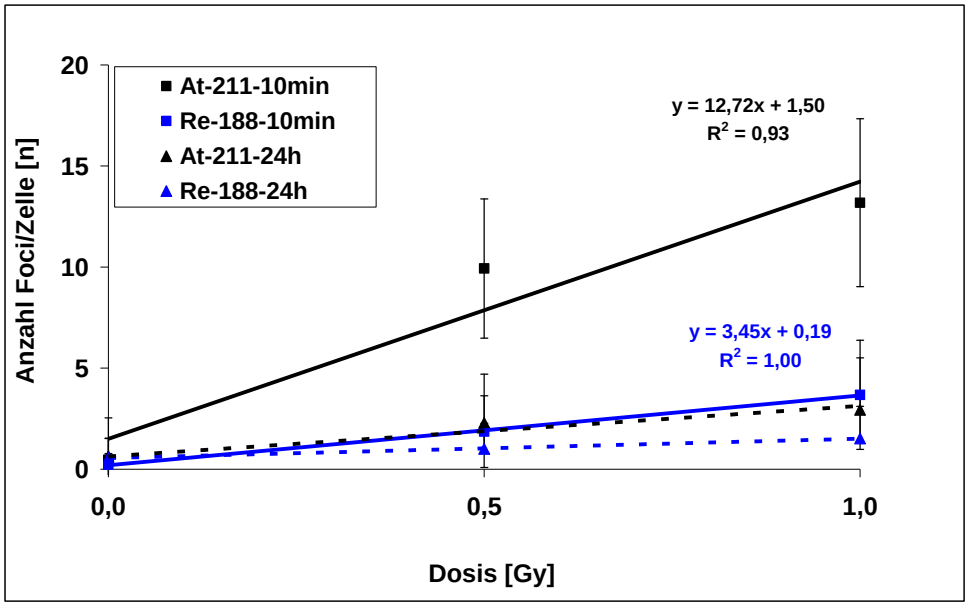

Abb. 39: Vergleich der DSB-Induktion und DSB-Reparatur in Lymphozyten für 0,5 Gy und 1 Gy ^{188}Re und ^{211}At nach 10 min und 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-4 Versuchen und die gemittelte Standardabweichung.

Der Zeitverlauf der γ-H2AX-Foci-Entstehung nach Behandlung mit Doxorubicin unterschied sich mit der verzögerten Entstehung der Foci deutlich von den Kinetiken der γ-H2AX-Foci-Bildung für die Radionuklide.

Um die biologische Wirkung zwischen beiden Strahlenqualitäten zu vergleichen, wurden zwei Dosispunkte und die Reparaturzeiten 10 min, 2 h und 24 h ausgesucht (vgl. Abb. 40).

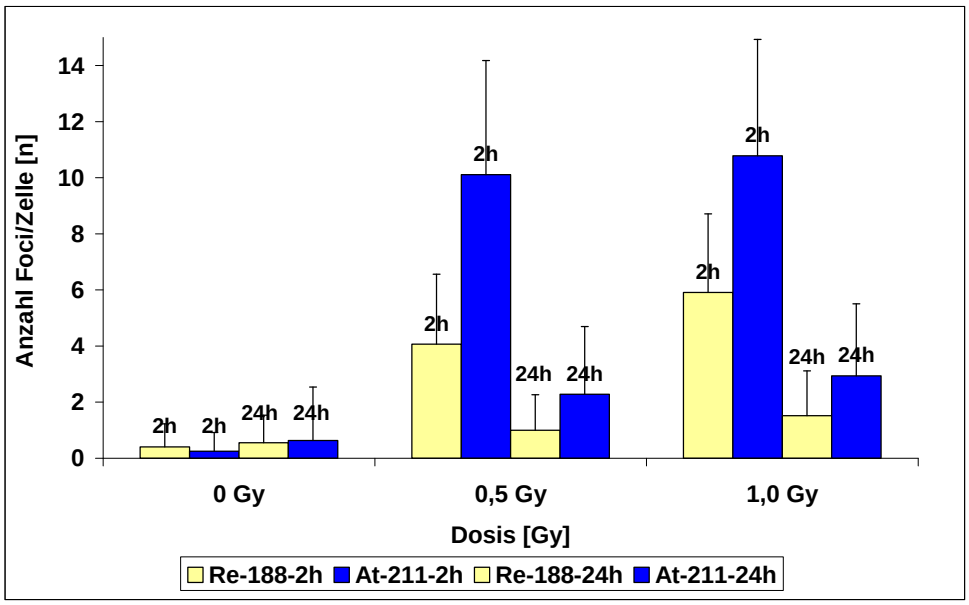

Abb. 40: Vergleich der DSB-Induktion und DSB-Reparatur in Lymphozyten für 0,5 Gy und 1 Gy ^{188}Re und ^{211}At nach 2 h und 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-4 Versuchen und die gemittelte Standardabweichung.

Die Berechnung der relativen Reparaturkapazität bezogen auf die maximale Anzahl der Foci/Zelle ergab für ^{211}At kaum Unterschiede im Vergleich zu ^{188}Re. Nach 24 Stunden blieb ein Restschaden von 23 % (^{211}At) und 26 % (^{188}Re) bezogen auf den Maximalschaden bei beiden Strahlenqualitäten bestehen (vgl. Abb. 41)

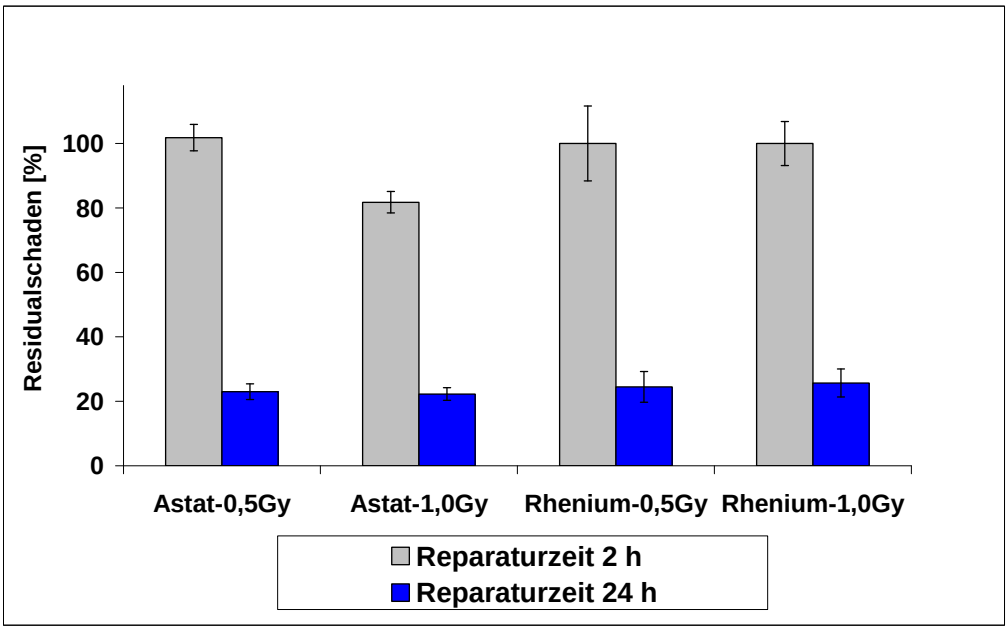

Abb. 41: Residualschäden nach 24 h Reparaturzeit für ^{211}At und ^{188}Re bei 0,5 Gy und 1 Gy bezogen auf den maximalen Schaden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-4 Versuchen und die gemittelte Standardabweichung.

Bemerkenswert ist, dass eine Übereinstimmung bezüglich der Reparaturkapazität nach Exposition mit Alpha- und Beta-Emitter gezeigt werden konnte.
Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Resultaten der DSB-detektierenden Methode neutraler Komet-Assay und werden im Abschnitt 4.4.3 diskutiert.

3.4 Detektion von Apoptose mit Annexin V-FITC/PI-Durchflusszytometrie

Mit der Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate nach Bestrahlung mit dem Alpha- und Beta-Emitter sollte eine Aussage zum Überleben bzw. dem Zelltod der mononukleären Blutzellen getroffen werden.

Nach dem Ende der Bestrahlung wurden die PBMC 24 h und 44 h in Kulturflaschen bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt, der 1 h-Wert ergab sich durch die Aufarbeitungszeit für die Annexin V-/PI-Färbung bei Raumtemperatur. In die Auswertung der FACS-Analyse wurden alle mononukleären Zellen einbezogen, da die Ergebnisse des Komet-Assays und der γ–H2AX-Methode analog auf der Gesamtheit der PBMC (80 % Lymphozyten) beruhen.

Die Ergebnisse wurden auf die spontane Apoptose der Kontrollzellen des jeweiligen Versuches bezogen und daraus die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet.

Zur Ermittlung der spezifischen Aoptoserate wurde von den Messwerten der Proben (x) der Messwert der Kontrollzellen (K) abgezogen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\left(\frac{x - K}{100 - K} \right) \times 100$$

.

3.4.1 Effekt von ^{211}At auf die Apoptoserate

Die Induktion von Apoptose und Nekrose wurde nach Exposition der humanen Lymphozyten mit dem Alpha-Strahler ^{211}At für die Dosen von 2 Gy, 5 Gy, 7,5 Gy sowie 10 Gy untersucht. Die Abb. 42 zeigt exemplarisch die Dot-Plot-Diagramme eines Versuchstages von insgesamt drei ^{211}At-Versuchen für die Kontrolle, die Dosis von 5 Gy und die Zeiten 1 h, 24 h und 44 h nach der Bestrahlung.

Mit der Annexin V/PI-Methode ist die Unterscheidung zwischen frühen Apoptoseformen und Spätapotose/Nekrose möglich. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte dementsprechend für apoptotische (A^+/PI^-) und spätapoptotische/nekrotische (A^+/PI^+) Zellen separat (vgl. Abb. 43, Abb. 44)

Kurz nach Bestrahlungsende (1 h) zeigte sich bei Annexin V-positiven Zellen eine niedrige Apoptoserate, die mit steigender Dosis zunahm, 1,2 % bis 5,4 % bei 10 Gy (siehe Abb. 43). Nach 24 h stieg der Anteil apoptotischer Zellen deutlich an (47 %; 34 %; 36 %; 43 %), eine Dosisabhängigkeit war bei den Dosen >2 Gy erkennbar. Ein moderates Absinken des Anteils apoptotischer Zellen wurde nach 44 h gemessen, eine Ausnahme bildete das Ergebnis bei 5,0 Gy mit einem extremen Rückgang des Apoptoseindexes auf 13,4 %.

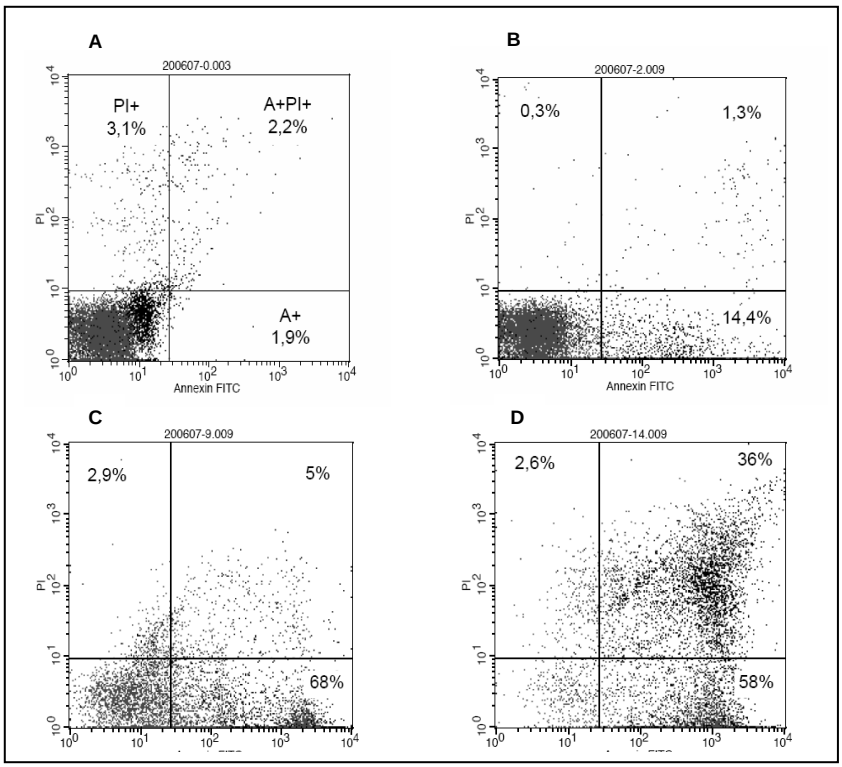

Abb. 42: Durchflusszytometrische Analyse Annexin V/PI-gefärbter Lymphozyten nach Bestrahlung mit 5 Gy ^{211}At eines Versuches. A. unbestrahlte Kontrolle, B: 1 h nach Bestrahlung, C: 24 h und D: 44 h. Der rechte untere Quadrant zeigt frühapoptotische Zellen, der rechte obere Quadrant spätapoptotische Zellen. Die Werte in den Quadranten beruhen auf den unnormierten Daten.

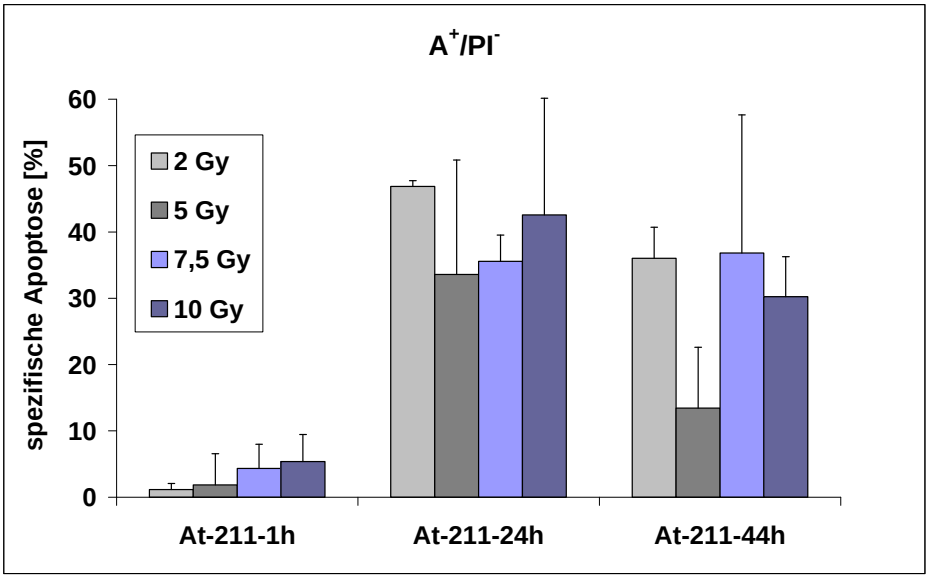

Abb. 43: Anteil apoptotischer Lymphozyten (Annexin V-positiv/PI-negativ) nach Bestrahlung mit ^{211}At; 1 h, 24 h und 44 h nach Exposition der Zellen mit ^{211}At. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen und die Standardabweichung für die normierten Daten.

Die mit 5 Gy exponierten Zellen, die nach 44 h aus dem unteren rechten Quadranten des Dotblots verschwanden, waren im rechten oberen Quadranten zu finden (siehe Abb. 42). Diese Zellen waren scheinbar so stark geschädigt, dass sofort ein Übergang in die spätapoptotische Phase eingeleitet wurde.

Überraschenderweise wurden nach den Dosen von 7,5 Gy und 10 Gy weniger spät-apoptotische/nekrotische (A^+/PI^+) Zellen gemessen als nach 5 Gy (Abb. 44) und gleichzeitig eine höhere Rate apoptotischer (A^+/PI^-) Zellen (Abb. 43). Offensichtlich existieren Unterschiede im Zeitverlauf der Apoptoseinduktion in Bezug auf die Subpopulationen der Gesamtheit der PBMC. Strahlensensiblere Zellen könnten vor der Messung in den Zelltod eingetreten sein, weniger strahlensensible Zellen hingegen unterlagen einem verzögerten Zeitverlauf der Apoptoseeinleitung. Einen Hinweis auf diese Vermutungen gab die Betrachtung der Anzahl analysierter Zellen: nach 44 h befanden sich deutlich weniger Zellen im festgelegten Detektionsbereich des Zytometers (% im Gate), so dass diese Zellen nicht erfasst wurden, da sie als Zellfragmente vorlagen.

Während sich nach 24 h der Anteil spätapoptotischer/nekrotischer Zellen nur marginal von den 1 h-Werten unterschied, wurde nach 44 h ein deutlicher Anstieg der Spätapoptoserate mit Annexin V- und PI-positiven Zellen bestimmt (vgl. Abb. 44, Abb. 43).

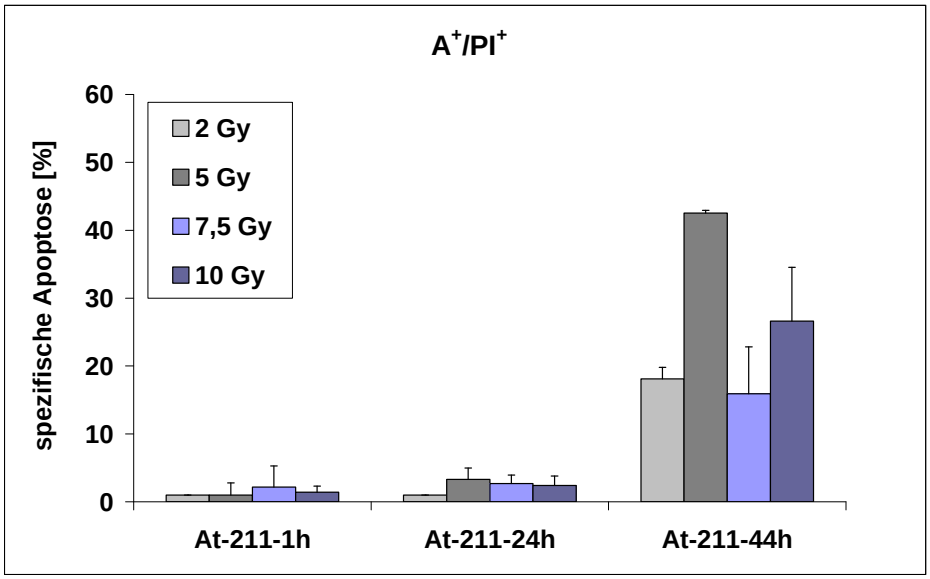

Abb. 44: Anteil spätapoptotischer/nekrotischer Lymphozyten (Annexin V-positiv/PI-positiv) nach Bestrahlung mit ^{211}At 1 h, 24 h und 44 h nach Exposition der Zellen mit ^{211}At. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen und die Standardabweichung für die normierten Daten.

Eine Korrelation der Apoptoseraten mit der Dosissteigerung wurde für spätapoptotische Ereignisse nicht gefunden (vgl. Abb. 44). Die Apoptoseinduktion mit der Detektion Annexin V-positiver Zellen ließ nach 1 h und 24 h eine Dosisabhängigkeit erkennen, eine Ausnahme bildete der 2 Gy-Wert nach 24 h (Abb. 44). Eine Ursache könnte in der Auswahl der Dosen für die Exposition mit ^{211}At liegen, die scheinbar im Sättigungsbereich des biologischen Endpunktes lagen. Andererseits sollte eine Übereinstimmung mit den Dosispunkten für ^{188}Re gewährleistet werden.

3.4.2 Effekt von ^{188}Re auf die Apoptoserate

Um die Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion nach Exposition mit ^{188}Re zu untersuchen, wurden die Lymphozyten mit 2 Gy, 5 Gy, 10 Gy sowie 15 Gy bestrahlt. Die Zeitfenster nach dem Ende der Bestrahlung entsprachen denen der ^{211}At-Versuche (1 h, 24 h, 44 h). Die Dot-Plot-Diagramme (Abb. 45) zeigen beispielhaft einen von vier ^{188}Re-Versuchen: die unbestrahlte Kontrolle sowie mit 5 Gy ^{188}Re bestrahlte Zellen nach 1 h, 20 h und 44 h.

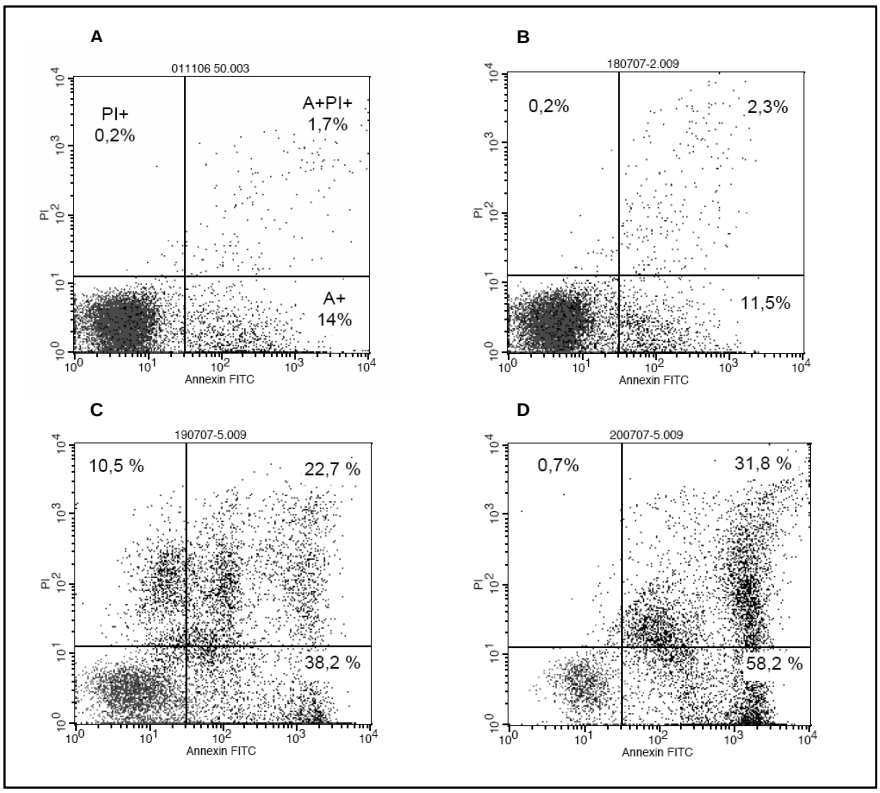

Abb. 45: Durchflusszytometrische Analyse Annexin V/PI-gefärbter Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy ^{188}Re eines Versuches A. unbestrahlte Kontrolle, B: 1 h nach Bestrahlung, C: 24 h und D: 44 h. Der rechte untere Quadrant zeigt frühapoptotische Zellen, der rechte obere Quadrant spätapoptotische Zellen. Die Werte in den Quadranten beruhen auf unnormierten Daten.

Eine Stunde nach Bestrahlung wurden kaum erhöhte Anteile apoptotischer Zellen gefunden (maximal 3 % bei 10 Gy). Der Anteil Annexin V-positiver Zellen stieg nach 24 h deutlich an, beispielsweise bei den Dosispunkten 5 Gy und 10 Gy auf eine Apoptoserate von 27 % und 34 %. Einen Tag nach Dosisapplikation konnte ein dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate gezeigt werden. (vgl. Abb. 46).

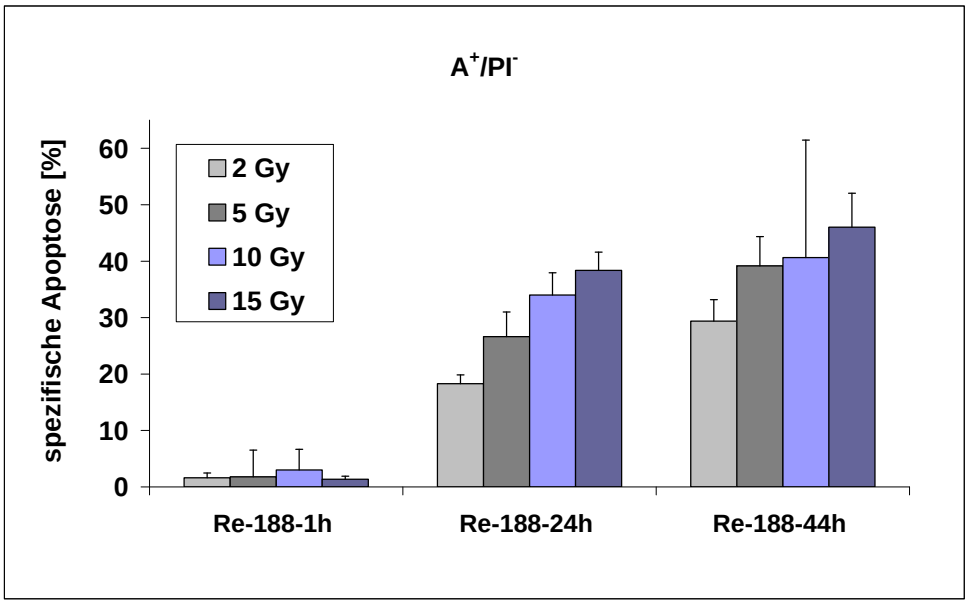

Abb. 46: Anteil apoptotischer Lymphozyten (Annexin V-positiv/PI-negativ) für ^{188}Re 1 h, 24 h und 44 h nach Exposition der Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Versuchen und die Standardabweichung für die normierten Daten.

Am zweiten Tag (44 h) nach Bestrahlung der PBMC wurde im Vergleich zu den 24 h-Werten ein weiterer Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen gefunden, der jedoch eine weniger ausgeprägte Dosiseskorrelation aufwies als die 24 h-Werte (siehe Abb. 46).

Mit den ^{188}Re-Versuchsreihen konnten dosisabhängige Anstiege der Apoptoseraten Annexin V-positiver Zellen analysiert werden (Abb. 46). Im gewählten Dosisbereich bis 15 Gy traten keine Sättigungseffekte auf.

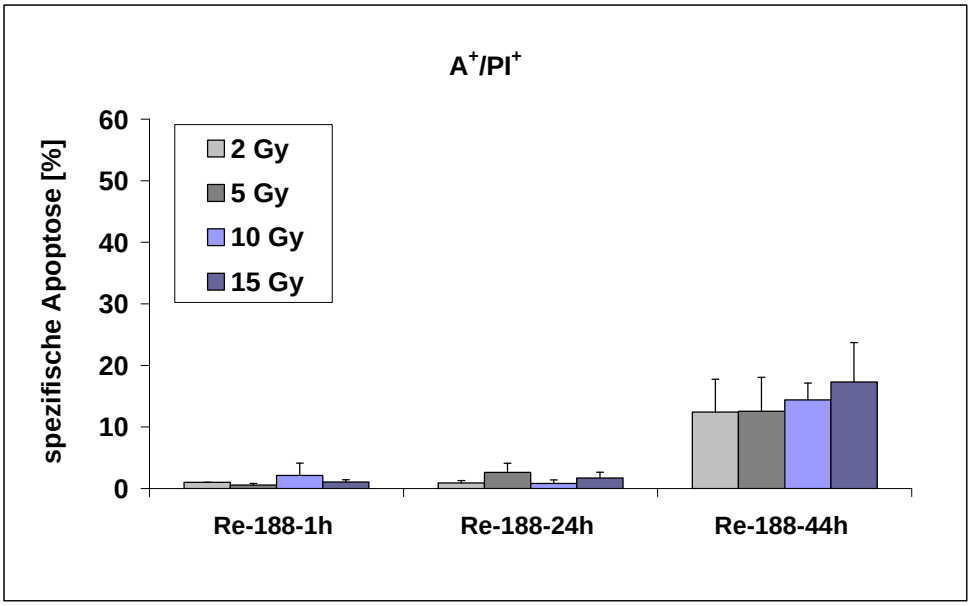

Abb. 47: Anteil spätapoptotischer/nekrotischer Lymphozyten (Annexin V-positiv/PI-positiv) für ^{188}Re 1 h, 24 h und 44 h nach Exposition der Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Versuchen und die Standardabweichung für die normierten Daten.

Der Anteil doppelt gefärbter Zellen (A^+/PI^+) bewegte sich nach 24 h im Bereich von 2 % -3 % und blieb auf dem Niveau des 1 h-Wertes. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zahl der Zellen, die durch Strahlenexposition spätapoptotische/nekrotische Merkmale zeigten, in diesem Zeitfenster nicht anstieg. Erst nach 44 h konnte ein leichter Anstieg der Annexin V-positiven und PI-positiven Zellen von 14,4 % und 17,3 % für 10 Gy und 15 Gy verzeichnet werden (vgl. Abb. 47). Dabei wurde eine diskrete Dosiskorrelation ersichtlich.

3.4.3 Vergleichende Betrachtungen

Zum Vergleich der Induktion von Apoptose und Nekrose in Lymphozyten durch Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten wurden die Messergebnisse von jeweils drei Dosispunkten von ^{211}At und ^{188}Re miteinander verglichen.

Das Diagramm der Abb. 48 veranschaulicht die Ergebnisse für die apoptotischen (A^+/PI^-) Zellen. Die Unterschiede zwischen beiden Radionukliden hinsichtlich der Apoptoseinduktion liegen in der Höhe der Apoptoserate, der Korrelation zwischen Apoptoseindex und Dosis sowie im Zeitverlauf des Auftretens von Apoptose und Spätapoptose/Nekrose. Die nach ^{211}At erzeugten Apoptoseraten waren bei den vergleichbaren Dosen sowohl für die apoptotischen (A^+/PI^-), als auch für die spätapoptotischen/nekrotischen Zellen (A^+/PI^+) höher als nach Schädigung mit ^{188}Re (Abb. 48, Abb. 49).

Ein Zusammenhang zwischen Dosiserhöhung und Apoptoserate stellte sich für ^{188}Re-behandelte Lymphozyten dar, sowie eine weitere Zunahme der Rate apoptotischer Zellen nach 44 h (Abb. 48). Im Kontrast dazu, konnte nach Bestrahlung mit ^{211}At keine Korrelation zwischen Dosis und Apoptoseindex gemessen werden. Desweiteren wurde im Gegensatz zu ^{188}Re ein Absinken des Anteils apoptotischer Zellen nach 44 h im Vergleich zu 24 h gemessen werden (siehe 3.5.1).

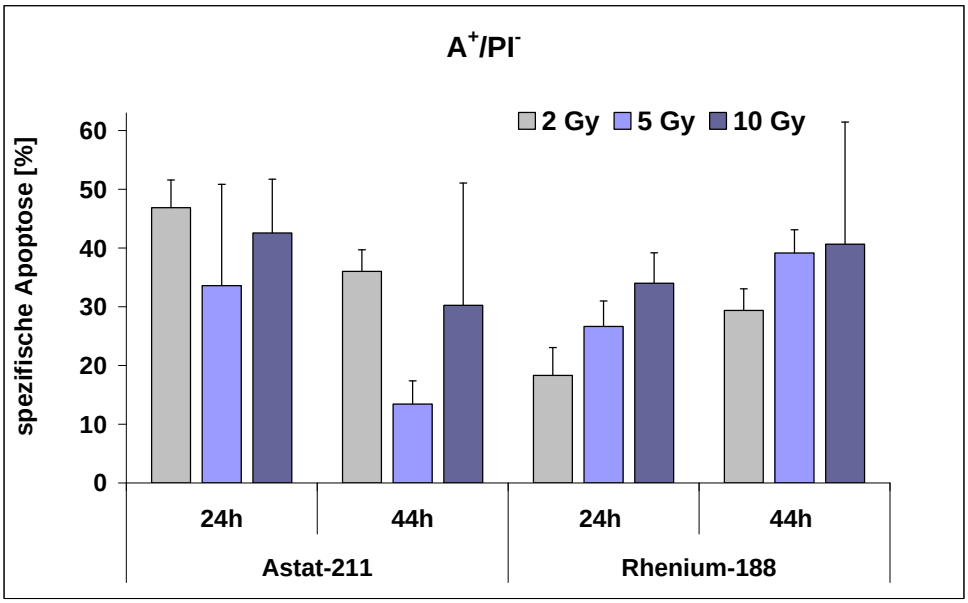

Abb. 48: Vergleich der Apoptoseraten (Annexin V-positiv/ PI-negativ) für ^{211}At und ^{188}Re mit den Dosen 2 Gy, 5 Gy und 10 Gy; 24 h und 44 h nach Exposition der Lymphozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 und 4 Versuchen und die Standardabweichung für die normierten Daten.

Bei der Darstellung der Ergebnisse in Abschnitt 3.5.1 (Abb. 43) wurde gezeigt, dass für die 1 h-Reihe bei ^{211}At eine Dosiskorrelation angenommen werden kann, die bei ^{188}Re weniger deutlich ausgeprägt war (Abb. 46).

Betrachtet man die Messungen der spätapoptotischen/nekrotischen Anteile der bestrahlten Lymphozyten nach 24 h wurden keine Unterschiede zwischen den Nukliden getestet. Nach 44 h dagegen fielen die höheren Apoptoseraten nach Exposition mit ^{211}At im Vergleich zu ^{188}Re auf (Abb. 49). Die bei den rein apoptotischen Zellen detektierte Dosiskorrelation für die ^{188}Re-Versuchreihe konnte bei den doppelt gefärbten, spätapoptotischen Zellen nicht verifiziert werden.

Die mit dem Alpha-Emitter bewirkten Effekte beruhen offensichtlich auf komplexeren Mechanismen, da keine überzeugende Dosiskorrelation sowie andere Zeitverläufe für die Apoptosestadien im Vergleich zu ^{188}Re festgestellt wurden. Zudem könnten die Ergebnisse der Dosispunkte >2 Gy durch biologisch-methodische Limitationen verfälscht worden sein.

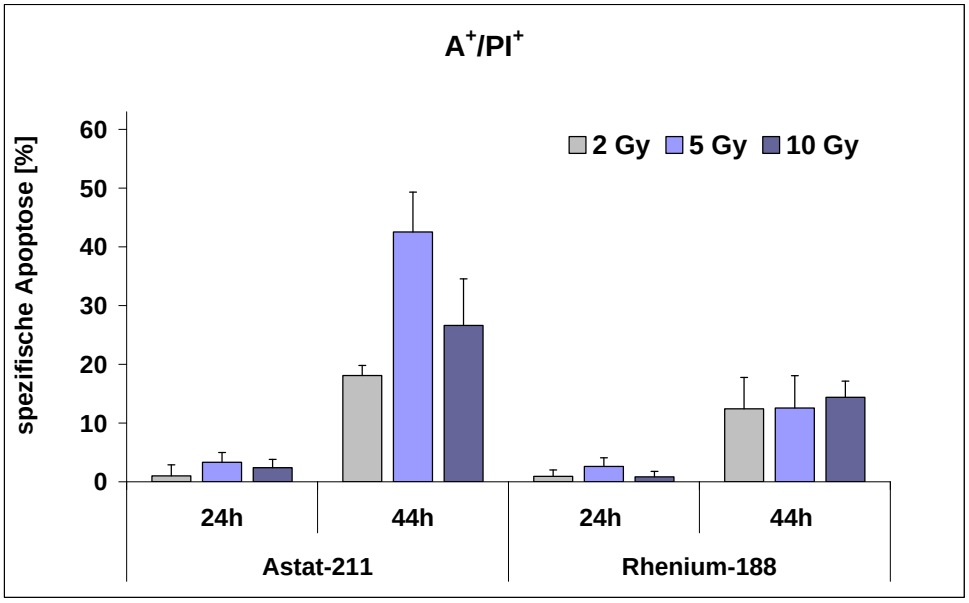

Abb. 49: Vergleich der Apoptoseraten (Annexin V-positiv/PI-positiv) für ^{211}At und ^{188}Re mit den Dosen 2 Gy, 5 Gy und 10 Gy; 24 h und 44 h nach Exposition der Lymphozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 und 4 Versuchen und die Standardabweichung für die normierten Daten.

Der Vergleich der biologischen Effekte bei gleichen Dosen des Alpha-Emitters ^{211}At mit dem Beta-Emitter ^{188}Re wurde in Abschnitt 4.6 dargestellt (vgl. Tab. 22)

4. Diskussion

Energiereiche Strahlung verursacht Schäden unterschiedlicher Komplexität. Dazu gehören das Entstehen von Einzel- und Doppelstrangbrüchen, die Chromosomenaberrationen oder der Zelltod. Diese Schäden können mit verschiedenen Testen nachgewiesen werden: Filter-Elution, Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und Einzelzell-Gelektrophorese (Komet-Assay) zum Nachweis von DNA-Schäden, der Mikronukleus-Test und die klassische Chromosomenanalyse zum Nachweis von Chromosomenschäden sowie der Nachweis des klonogenen Überlebens der Zelle durch den Koloniebildungstest.
Effekte, die nicht von der Schädigung der DNA abhängen, sondern denen membranabhängige Mechanismen zu Grunde liegen wie Apoptose (Phosphatidylserin-Annexin V), Bystander response und adaptive Antwort und [169] gehören zu den Mechanismen der so genannten „non-targeted response“. Sie können jedoch nach DNA-Schädigung ebenso als indirekte Wirkung auftreten.
In Abhängigkeit von der Qualität des DNA-Schadens (ESB oder DSB) und dem Reparaturmechanismus werden schnelle und langsame Reparaturprozesse unterschieden. Die Mehrzahl der Einzelstrangbrüche ist mit Reparaturhalbwertszeiten von einigen Minuten beseitigt. Die Reparaturhalbwertszeiten von Doppelstrangbrüchen liegen aufgrund komplexer Mechanismen wie der homologen Rekombination (HR), sowie dem „Non-Homologous-End-Joining“ (NHEJ) bei 1,5 - 4 Stunden [167]. Irreparable Schäden beeinträchtigen das Überleben der Zelle (Apoptose/Nekrose, klonogenes Zellüberleben) bzw. führen zu Mutationen an der DNA (NHEJ, Chromosomenaberrationen).
Abhängig von der regionalen Energiedeposition bzw. Energiedichte der Strahlung (Linearer Energietransfer, LET) überwiegen Doppelstrangbrüche bei hohem LET (Alpha-Strahler) gegenüber Einzelstrangbrüchen bei niedrigem LET (Beta- und Gamma-Strahlung).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit von Alpha- und Beta-Strahlung sowie dem Einfluss eines Zytostatikums auf humane Lymphozyten.
In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob die Art des Strahlenschadens (Einzel- oder Doppelstrangbruch) der Wirkung der unterschiedlichen DNA-schädigenden Noxen zuzuordnen ist. Die biologische Wirkung wurde mit unterschiedlichen Methoden detektiert und die qualitative und quantitative Übereinstimmung der Ergebnisse überprüft.
Dazu wurden Messungen nach Schädigung mit dem Alpha-Strahler ^{211}At, dem Beta-Strahler ^{188}Re und dem Zytostatikum Doxorubicin mit dem alkalischen und neutralen Komet-Assay sowie der γ-H2AX-Immunfluoreszenz und der Annexin V/PI-Durchflusszytometrie an Lymphozyten durchgeführt.

4.1 Biologisches Testsystem

Lymphozyten bilden etwa 75 % - 85 % der Gesamtheit der mononukleären Zellen im Vollblut. Sie können in B- und T-Lymphozyten, sowie in natürliche Killerzellen (NK-Zellen) unterteilt werden [39].

Die Zellen des hämapoetischen und lymphoiden Systems sind besonders strahlensensibel und deswegen ein häufig genutztes Testsystem zur Detektion von DNA-Schäden, die durch energiereiche Strahlung induziert wurden. Lymphozyten proliferieren unter in vitro Bedingungen nicht, sondern bleiben in der G_0-Phase des Zellzyklus.

Lymphozyten werden als so sensitiv erachtet, dass sie als Surrogatzellen ein Frühwarnsystem für genetische Risiken darstellen können [128, 180]. Periphere Lymphozyten werden deshalb als prognostischer Faktor zur Beurteilung der Radiosensitivtät von Tumorpatienten eingesetzt [58, 99, 215].

Eine hohe interindividuelle Variabilität der induzierten DNA-Schäden an Lymphozyten wird beschrieben [32], eine Variabilität besteht ebenso im Reparaturverhalten nach Schädigung [10]. Als Ursache für die unterschiedliche individuelle Strahlensensibilität werden der genetisch bedingte Gehalt an Radikalfänger-Enzymen und Metaboliten diskutiert [123, 212], der AT-Status [27, 48, 92] sowie die genetische Varianz von Basenexcisionsenzymen [54, 108, 201].

Bei Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit der Subpopulationen humaner Lymphozyten mit dem Mikronukleus-Test wurde eine höhere Empfindlichkeit der B-Lymphozyten gegenüber T-Lymphozyten bei Bestrahlung mit der Röntgenröhre [223] sowie nach Radioiodtherapie [213] gefunden.

Die Bestimmung der Apoptoserate (Annexin V-FITC) der Arbeitsgruppen um Kern [97] und Schmitz [184] führte zu dem Ergebnis, dass unstimulierte Lymphozyten radioresistenter als stimulierte sind und sich die B-Lymphozyten sensitiver als die T-Lymphozyten erwiesen.

Die zusammenfassende Betrachtung der zitierten Ergebnisse weist darauf hin, dass die unterschiedliche individuelle Strahlensensibilität eine Variabilität der biologischen Wirkung bedingt. Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit bestehen zudem zwischen den Subpopulationen der Lymphozyten.

Die diskutierte Problematik muss bei der Interpretation der eigenen Daten berücksichtigt werden. Ausschlusskriterien bei der Auswahl der Spender für die Versuche der vorliegenden Arbeit waren Erkrankungen des Immunsystems oder bekannte maligne Tumore.

4.2 Alkalischer Komet-Assay

Der Komet Assay ist eine weit verbreitete Methode, um mit geringem Aufwand DNA-Schäden durch unterschiedliche Noxen zu charakterisieren [53, 72, 111, 124, 131, 143, 151, 156, 210]. Anwendung findet diese Methode in der Radiobiologie [14, 24, 132, 220, 221], zur Testung der Genotoxizität in vivo [76, 101, 205] und in vitro [78, 181, 182, 198], beim humanen Biomonitoring [35], sowie zur Diagnostik genetisch bedingter Dispositionen für maligne Tumore [71, 100, 125].

Für die Standardisierung der Komet-Methode liegen umfangreiche Empfehlungen für die Laborpraxis vor [33, 140, 149, 193].

Auf zellbiologischer Ebene werden im Komet-Assay nach der Schädigung mit ionisierender Strahlung Schleifen (loops) der relaxierten DNA-Helix statt echter Bruchstücke gemessen. Dies ist eine Erklärung für die Beobachtungen von Collins et al. [34] und Cook et al. [36], dass mit steigender Schädigung der DNA-Anteil außerhalb des Zellkerns expandiert, die Länge des Schweifes jedoch nicht mehr ansteigt.

Eine große Anzahl von Arbeitsgruppen fanden lineare Abhängigkeiten zwischen dem detektierten DNA-Schaden und der Dosis [44, 70, 102, 50, 216]. Bocker et al. etablierten eine Methode zur automatischen Auswertung der Objektträger [21].

Für die eigenen Arbeiten wurde das Tail-Moment als Maß für die Schädigung gewählt, welches nach Olive [150, 154] und Kumuravel [102] ein gutes Korrelat zu DNA-Einzelstrangbrüchen darstellt. Wird eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Daten anderer Laboratorien angestrebt, sollte der relative Parameter DNA-Gehalt im Schweif (% Tail-DNA) Anwendung finden [33, 102].

Eigene Vorarbeiten zeigten eine gute Übereinstimmung bei der Auswertung mit der Software Komet 6.0 GLP durch verschiedene Personen, aber eine schlechtere Reproduzierbarkeit zwischen unterschiedlichen Spendern.

4.2.1 Effekte der DNA-schädigenden Noxen

Initiale DNA-Schäden ^{211}At

Nach Bestrahlung der Lymphozyten mit dem Alpha-Strahler ^{211}At wurde eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung gefunden (vgl. Abb. 8). Die Kurve zeigte vor allem im Niedrig-Dosis-Bereich einen relativ flachen Anstieg. Beispielsweise stieg das Tail-Moment bei Erhöhung der Dosis von 2 Gy auf 4 Gy um den Faktor 1,15. Obwohl sich der Mittelwert der kleinsten applizierten Dosis von 2 Gy vom Mittelwert der Kontrollzellen unterschied, konnten mit der Varianzanalyse statistisch signifikante Dosiseffekte erst ab 11,7 Gy ermittelt werden (vgl. Tab. 11).

Bei der Untersuchung der Radiotoxizität von ^{211}At konnte keine Normalverteilung der Messwerte bestätigt werden. Eine mögliche Ursache für die nicht normalverteilten Werte bei ^{211}At besteht in der sehr kurzen Reichweite (max. 70 µm) der Alpha-Strahlung. Betrachtungen zur Anzahl der Treffer pro Zelle werden unter 4.2.2 ausgeführt.

Rössler et al. [174] fanden bei Bestrahlung von humanen Lymphozyten mit dem Alpha-Emitter ^{241}Am ein relativ hohes Detektionslimit des alkalischen Komet-Assays von 2 Gy und eine Nachweisgrenze bei Gamma-Strahlung von 0,5 Gy. Im Vergleich zu den eigenen Daten bestanden Unterschiede in den Auswertekriterien (höherer Stichprobenumfang pro Dosis, Median) und den Versuchsbedingungen.

Experimente zur Sensitivierung von humanen Myelomzellen von Supiot et al. [196] detektierten mit Bi^{213}-CHX-A-DTPA, einem Antikörper zur Radioimmuntherapie, mit dem alkalischen Komet-Assay kaum messbare DNA-Schäden.

Initiale DNA-Schäden ^{188}Re

Die Bestrahlungsversuche mit dem Beta-Emitter ^{188}Re zeigten mit steigender Dosis einen deutlichen Anstieg des DNA-Schadens (vgl. Abb. 8). Das Tail-Moment nahm linear in Abhängigkeit von der Dosis zu, besonders im unteren Dosisbereich bewirkte eine Verdopplung der applizierten Energie (1,3 Gy auf 2,6 Gy) eine Steigerung des OTM um den Faktor 2,6. Die niedrigste Dosis von 1,3 Gy unterschied sich signifikant vom Kontrollwert. Im weiteren Kurvenverlauf setzte eine allmähliche Sättigung ein, die bei 10 Gy ihren Höhepunkt erreichte. Ab dieser Dosis war keine verlässliche Messung der DNA-Schäden mehr möglich, da die Zellen morphologisch erkennbar, massive Schäden (Apoptose) aufwiesen.

Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der DNA-Schädigung mit ^{131}I als Beta-Emitter (Anstieg um Faktor 2 bei Aktivitätsverdopplung sowie Sättigung im oberen Dosisbereich) publizierten Hengstler et al. [84].

Bei Bestrahlung mit ^{188}Re sind die Messwerte ab der Dosis 5 Gy normalverteilt. Die statistische Auswertung mit der Varianzanalyse ermittelte signifikante Unterschiede zwischen allen Dosispunkten (vgl. Tab. 12).

Initiale DNA-Schäden Doxorubicin

Die Detektion von DNA-Strangbrüchen (ESB und DSB) wurde mit einer Dosis-Wirkungs-Beziehung dargestellt (vgl. Abb. 17). Eine Sättigung der Induktion von DNA-Schäden bei der Konzentration von 68 µM (40 µg/ml) wurde nicht beobachtet. Die Messwerte variierten stark, da auch bei der größten Doxorubicin-Konzentration ein erheblicher Anteil Zellen ohne Strangbrüche blieben.

In Übereinstimmung mit den eigenen Experimenten wurden von Baumgartner et al. [14] für stimulierte Lymphozyten gefunden, dass nach Konzentrationserhöhung des Doxorubicins um

den Faktor 8 das Tail-Moment kaum einen Anstieg zeigte. Friesen et al. bestätigten die geringen DNA-Schäden (OTM<1,0) an lymphoblastoiden T-Zellen [65]. Anderson et al. wiesen nach Stimulation der Lymphozyten im Vergleich zu unstimulierten Lymphozyten einen signifikanten Anstieg des DNA-Schadens mit dem alkalischen Komet-Assay nach [4].
In einer weiteren Studie von Olive und Banath an Tumorzellen wurde gezeigt, dass Doxorubicin den DNA-Schaden bei kleinen Konzentrationen gut reflektiert, aber bei hohen Konzentrationen eine Unterschätzung der DNA-schädigenden Wirkung im alkalischen Komet-Assay erfolgte [147].

4.2.2 Vergleich der DNA-schädigenden Noxen

Initiale DNA-Schäden ^{211}At und ^{188}Re

Beim Vergleich der initialen DNA-Schäden nach Bestrahlung der mononukleären Blutzellen mit beiden Strahlenqualitäten wurde im gleichen Dosisbereich nach Schädigung mit Beta-Strahlung eine höhere Wirkung gefunden als bei Applikation von Alpha-Strahlung (vgl. Abb. 8). Stellt man die initialen Schäden jedoch in Abhängigkeit von der Anzahl der Kernumwandlungen (MBq*h/ml) dar, ergeben sich umgekehrte Verhältnisse (vgl. Abb. 9). Dieses Ergebnis reflektiert zwar die erwartete höhere biologische Wirksamkeit des Alpha-Emitters im Vergleich zum Beta-Strahler, die biologische Wirkung wird jedoch aus den isoeffektiven Dosen ermittelt. Eine Berechnung der biologischen Wirkung ergab interessanterweise im alkalischen Komet-Assay eine höhere Wirksamkeit für ^{188}Re (OTM ^{211}At / OTM ^{188}Re) 2,5 Gy, 5 Gy und 10 Gy: 0,57, 0,36, 0,28. Eine tabellarische Übersicht ist im Zusammenhang mit dem neutralen Komet-Assay unter 4.6 (Tab. 21) angeführt.
Ein weiterer Unterschied zwischen ^{211}At und ^{188}Re besteht in der statistischen Verteilung der Messwerte (^{211}At keine NV, ^{188}Re erfüllt NV). Die mikroskopische Auswertung zeigte bei allen Dosispunkten von ^{211}At sowohl Zellen mit migrierter DNA, als auch Zellen ohne sichtbare Kernschädigung, während bei Bestrahlung mit ^{188}Re die Gesamtheit der Zellen migrierte DNA-Bruchstücke aufwiesen. Bei Dosissteigerung auf 30 Gy ^{211}At entstanden zwar bei einem Teil der Zellen höhere DNA-Schäden, andererseits wurde ein hoher Anteil apoptotischer Zellen beobachtet (nicht als Ergebnis dargestellt).
Die Abschätzung der theoretischen Trefferanzahl pro Zelle für 1 MBq/ml ^{211}At und 1 MBq/ml ^{188}Re nach Stinchcomb et al. [195] ergab 8-10 Treffer bei Applikation von ^{211}At und 520 Treffer bei ^{188}Re. Für die Dosis ergab die Abschätzung der Trefferanzahl für 1 Gy ^{211}At etwa 3 Treffer pro Zelle, für 1 Gy ^{188}Re hingegen 1300. Die Berechnung basiert auf dem Kernradius von 4 µm für Lymphozyten, dem mittleren Energieverlust von etwa 100 keV/µm für ^{211}At sowie dem mittleren Energieverlust für ^{188}Re von 0,19 keV/µm.
Die Annahme, dass pro 1 Gy ionisierender Strahlung in Säugerzellen nur 25-40 Doppelstrangbrüche jedoch 1000 Einzelstrangbrüche verursacht werden [169, 211] und jeder mit

dem Hoch-LET-Emitter ^{211}At erzeugte Treffer einen oder mehrere DSB auf einem eng begrenzten DNA-Abschnitt (<20 bp) induziert (MDS vgl. 1.2), könnte einen Ansatz zu einer Erklärung liefern. Während durch Bestrahlung mit ^{188}Re kleinere DNA-Bruchstücke (ESB) in höherer Anzahl erzeugt werden, führt die Exposition mit ^{211}At zu wenigen Doppelstrangbrüchen, die vergleichsweise größere Bruchstücke erzeugen. Die widersprüchlichen Ergebnisse sind am ehesten mit der Empfindlichkeit der hier verwendeten Methode zu erklären. Die Sensitivität des alkalischen Komet-Assays ist nicht ausreichend, um die vom ^{211}At erzeugten DNA-Bruchstücke (vorwiegend DSB) zu detektieren.

Die im Folgenden aufgeführten Publikationen informieren über Vergleiche der biologischen Wirksamkeit unterschiedlicher Strahlenqualitäten. Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen berichtet die Mehrzahl der Arbeitsgruppen über einen Nachweis der höheren biologischen Effekte von Hoch-LET-Strahlern auch mit dem alkalischen Komet-Assay. Der Vergleich mit den eigenen Daten wird dadurch eingeschränkt, dass die Ergebnisse der zitierten Arbeitsgruppen auf dem Einsatz von ^{211}At- oder ^{213}Bi-Radioimmunkonjugaten beruhen, die eine spezifische Anreicherung an der Zelle bewirken und zugleich die Alpha-Partikel in definiertem Abstand zur DNA deponieren.

Über eine um den Faktor 2,5 höhere Wirksamkeit von Alpha-Partikeln (^{241}Am) im Vergleich zu Gamma-Strahlung (^{137}Cs) hinsichtlich des induzierten DNA-Schadens (Komet-Assay) berichteten Rössler et al. [174].

[^{213}Bi]anti-CD45 erzeugte an HL-60 Leukämiezellen höhere DNA-Schäden als [^{90}Y]anti-CD45, die mit dem alkalischen Komet-Assay detektiert werden konnten, Friesen et al. [64]. Der markierte Antkörper [^{213}Bi]anti-CD45 bindet an die Zellmembran der HL-60 Zellen, im Gegensatz dazu erfolgte keine Bindung des [^{211}At]-Astatids an Lymphozyten (eigene Vorversuche).

Am ehesten korrelieren die eigenen Ergebnisse mit denen von Mustonen et al. [135]. Verglichen wurde die Wirkung von Gamma-Strahlung (Cs-137) mit Neutronenstrahlung (14 MeV) an Raji-Zellen. Mit dem alkalischen Komet-Assay fanden die Autoren keine Unterschiede zwischen beiden Strahlenqualitäten hinsichtlich des detektierten DNA-Schadens.

Doxorubicin

Wie beim ^{211}At fiel eine Heterogenität der DNA-Schädigung auf, die durch die hohe Varianz der Messwerte in der Dosis-Wirkungs-Kurve (vgl. Abb. 17) veranschaulicht wird. Die DWK wies für Doxorubicin einen ähnlich flachen Anstieg wie für ^{211}At nach, im Gegensatz zu einem deutlichen Anstieg für ^{188}Re.

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass bei Detektion der Initialschäden mit dem alkalischen Komet-Assay durch die DSB-induzierenden Noxen ^{211}At und Doxorubicin die biologische Wirkung unterschätzt wird und diese Methode für die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen an Lymphozyten nur eingeschränkt geeignet ist. Dies wurde beim Vergleich mit anderen DSB-detektierenden Methoden, dem neutralen Komet-Assay und der γ-H2AX-Immunfluorszenz (vgl. 4.3 und 4.4) deutlich.

4.2.3 Reparatur der Initialschäden

Reparatur ^{211}At

Die Reparatur der initialen DNA-Schäden nach Bestrahlung der Lymphozyten mit ^{211}At wurde für zwei Dosispunkte über eine Stunde verfolgt (vgl. Abb. 20). Nach 4 Gy erfolgte eine geringfügige Reparatur (84 %), nach Bestrahlung mit 10 Gy wurden nach einer Stunde noch 56 % des initialen DNA-Schadens gemessen. Bis 20 h nach Bestrahlung erfolgte eine Fortsetzung der Reparatur auf 43 % bzw. 50 % Restschäden bezogen auf die initiale Schädigung.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Reparatur von DNA-Schäden komplexen Prozessen unterliegt, an denen verschiedene Enzyme beteiligt sind [47]. In der Literatur wurden kontroverse Ergebnisse publiziert. Mit CHO-Zellen fanden Dikomey et al. beispielsweise keinen Unterschied der Reparaturhalbwertszeit der DSB von der Dosis [47].

Im Gegensatz dazu und zu den eigenen Ergebnissen fanden Mustonen et al. [135] eine lineare Abhängigkeit zwischen der Dosis und den unreparierten DNA-Strangbrüchen.

In einem Artikel von Olive [139] wird die Möglichkeit verschiedener Reparaturmechanismen diskutiert, die von der Entfernung der Doppelstrangbrüche zueinander abhängen (10 Gy induzieren mehr DSB als 4 Gy).

Daher könnte eine Begründung für die effektivere Reparatur nach 10 Gy ^{211}At im Vergleich zu 4 Gy ^{211}At sein, dass eng nebeneinander liegende DNA-Bruchstellen, die bei Hoch-LET-Strahlung als MDS (multiply damaged sites) auftreten, von der Zelle als Einzelstrangbrüche identifiziert werden. Diese können von den verschiedenen Reparaturenzymen schneller beseitigt werden [139].

Reparatur ^{188}Re

Die Schadensreparatur nach Bestrahlung mit ^{188}Re wurde in Abschnitt 3.2.1 (Abb. 22) dargestellt und zeigt eine effiziente Abnahme der Anzahl der DNA-Strangbrüche über die Zeit. Bereits 15 min nach Bestrahlung betrug der Restschaden nur noch ein Viertel des Initialschadens. Die Reparaturhalbwertszeiten betrugen 7,5 bis 12 Minuten. Die Tab. 15 zeigt die Anteile unreparierter DNA-Schäden nach 15 min bis 120 min Reparaturzeit.

Übereinstimmende Ergebnisse präsentierten van der Schans [203] an Lymphozyten mit

Gamma-Strahlung (^{60}Co). Die Arbeitsgruppe um Gomolka [70] veröffentlichte Ergebnisse zu Reparaturstudien an Lymphozyten nach externer Gamma-Strahlung sowie Röntgenstrahlung in Konsistenz zu den Ergebnissen mit ^{188}Re (Reparatur in 1 Stunde auf weniger als 20 % Restschaden). Weitere Autoren beschrieben übereinstimmend an Lymphozyten Bauch [13] sowie an anderen Zelllinien Olive [145], Poller [166] sowie Müller [130] die schnelle und fast vollständige Reparatur. Banath et al. [10] zeigten an humanen periphereren mononukleären Blutzellen mit dem alkalischen Komet-Assay, dass etwa 50 % der Strangbrüche einer schnellen Reparatur zugeführt werden (0,5 h), die verbleibenden DNA-Schäden wurden mit einer Reparaturhalbwertszeit von 1,23 h beseitigt.

Reparatur Doxorubicin

Die Reparatur der DNA-Schäden wurde über eine Stunde mit drei Konzentrationen von Doxorubicin untersucht. Etwa die Hälfte der DNA-Schäden wurde innerhalb 1 h beseitigt (vgl. Abb. 23). Dies stimmt mit den Ergebnissen von L`Ecuyer [110] überein, die eine unvollständige DNA-Reparatur fanden. Über eine fast vollständige Beseitigung der DNA-Schäden an Lymphozyten berichteten dagegen Balsiak et al. [19]. Diese Ergebnisse wurden mit einer Doxorubicin-Konzentration von 0,1 µg/ml erzielt, die bei den eigenen Experimenten zum Reparaturverhalten nicht einbezogen wurde, da die Initialschäden sehr gering waren.
Die eigenen Versuchsergebnisse ließen keine Korrelation zwischen der Höhe der Residualschäden und den unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen zu. Nach Behandlung der Lymphozyten mit der niedrigsten Konzentration (6,8 µM) wurde beispielsweise eine geringere Reparaturkapazität als mit der 2,5-fach höheren Konzentration (17 µM) festgestellt. Da die induzierten Initialschäden nach diesen Konzentrationen im alkalischen Testsystem nicht signifikant unterschiedlich waren (vgl. Abb. 17) ist die Bewertung der DNA-Reparatur nur eingeschränkt möglich. Zudem wurde das Zeitfenster für die Beurteilung der Reparaturkinetik wahrscheinlich zu kurz gewählt, da durch Topoisomerase II-Hemmung verursachte DNA-Schäden zumeist DNA-Doppelstrangbrüche sind, die wiederum über komplexe Reparaturmechanismen beseitigt werden [17]. Als ein zweiter Wirkmechanismus von Doxorubicin wird die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert (vgl. 2.2.3). Bezüglich der Experimente zum Reparaturverhalten kann daher vermutet werden, dass vorrangig durch die Radikalbildung verursachte Einzelstrangbrüche und deren Reparatur gemessen wurden.
In der Literatur konnten keine Daten zur Reparaturkinetik in Abhängigkeit von unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen recherchiert werden.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Reparaturverläufe der beiden DSB-induzierenden Noxen ^{211}At und Doxorubicin ähnliche Ergebnisse zeigten.

Das Reparaturvermögen nach Bestrahlung mit ^{188}Re unterscheidet sich jedoch deutlich von den Reparaturververläufen nach ^{211}At und Doxorubicin. Die schnelle Beseitigung der DNA-Schäden nach Applikation von ^{188}Re und der geringe Residualschaden weisen auf die Reparatur von Einzelstrangbrüchen hin. Diese ESB konnten mit der Methode des alkalischen Komet-Assays detektiert werden (vgl. Tab. 15).

4.3 Neutraler Komet-Assay

Doppelstrangbrüche sind radiobiologisch relevante Schäden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Zelltod führen. Deshalb wird der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen ein hoher Stellenwert eingeräumt [157, 216, 219].
Die Arbeitsgruppe um Müller et al. [132] modifizierte die Originalversion von Olive [157] hinsichtlich Formulierung und pH-Wert des Lyse- und Elektrophoresepuffers. Die Lyse bei pH 9,5 vermeidet die Induktion von Brüchen durch alkalilabile Stellen [167] sowie die Denaturierung der DNA-Helix (ab pH 11) [216]. Kontroverse Diskussionen zur Spezifität des neutralen Komet-Assays haben sowohl den Einfluss des pH-Wertes, als auch die Bedingungen bei Lyse und Elektrophorese zum Inhalt. Müller et al. [132] konnten anhand ihrer Experimente schlussfolgern, dass nicht nur der pH-Wert Einfluss auf die Morphologie der migrierten DNA hat, sondern auch die Lysezeit und die elektrische Feldstärke während der Elektrophorese. Brammer et al. [24] vertreten die Meinung, dass im unteren Dosisbereich von 2-5 Gy unter bestimmten methodischen Einflüssen auf Grund der Konformationsänderung der DNA-Superhelix auch Einzelstrangbrüche detektiert werden können.
Experimentelle Daten mit Anwendung des neutralen Komet-Assays sind wesentlich seltener als die Anwendung der alkalischen Variante, da aufgrund der geringeren Sensitivität physiologisch relevante Dosisbereiche nicht erfasst werden können. Hinzu kommt, dass in den letzten Jahren sensitivere Methoden zur Erfassung von DNA-Doppelstrangbrüchen entwickelt wurden.

4.3.1 Effekte der DNA-schädigenden Noxen

Initiale DNA-Schäden ^{211}At

Die Initialschäden nach Exposition von ^{211}At wurden im Dosisbereich von 0 Gy bis 110 Gy bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Doppelstrangbrüche als Funktion der Dosis zeigte einen linearen Anstieg (vgl. Abb. 13). Für 20 Gy war ein Anstieg des Tail-Moments auf das Doppelte der Kontrolle zu sehen, bei weiterer Dosissteigerung auf 110 Gy wurde ein weiterer Anstieg der detektierten DNA-Schäden gemessen.
Im Gegensatz zum alkalischen Komet-Assay ermittelte die Varianzanalyse im neutralen Komet-Assay signifikante Unterschiede der Messwerte (OTM) zwischen allen Dosispunkten.

Die Zellmorphologie unterschied sich vom alkalischen Komet-Protokoll darin, dass die Zellpopulation eine homogene Verteilung der DNA-Schäden aufwies (alle Zellen mit migrierter DNA).
Damit wurde die Eignung der Methode zur Detektion von DNA-Schäden nach Bestrahlung mit ^{211}At nachgewiesen.

Initiale DNA-Schäden ^{188}Re

Die Wirkung des Beta-Emitters ^{188}Re hinsichtlich der DNA-Doppelstrangbruch-Induktion wurde im gleichen Dosisbereich wie für ^{211}At untersucht. Die Geradengleichung zeigte einen flacheren Anstieg als die ^{211}At-Kurve (vgl. Abb. 13). Im unteren Dosisbereich (10 Gy) war das Tail-Moment um den Faktor 1,8 gegenüber der Kontrolle erhöht. Bei Dosiseskalation auf 110 Gy stieg das OTM um den Faktor 2,8 im Vergleich zur Kontrolle an.
Im Gegensatz zum alkalischen Komet-Assay ermittelte die Varianzanalyse nur signifikante Unterschiede der Messwerte (OTM) zwischen 0 Gy und 10 Gy sowie zwischen 75 Gy und 110 Gy.

Initiale DNA-Schäden Doxorubicin

Die Detektion von Doppelstrangbrüchen nach Inkubation der Lymphozyten mit Doxorubicin bei 37 °C wurde im gleichen Konzentrationsbereich wie im alkalischen Komet-Assay durchgeführt.
Der Kurvenanstieg war etwa um das Doppelte steiler als im alkalischen Komet-Assay (vgl. Abb. 17). Bei einer Steigerung der Konzentration von Doxorubicin um den Faktor 10 bzw. Faktor 40 stieg das OTM jeweils etwa um das Doppelte an. Die Messwerte variierten stark (keine Normalverteilung), da auch bei der größten Doxorubicin-Konzentration ein Teil der Zellen ohne DNA-Strangbrüche blieben.
Zur Detektion von Doppelstrangbrüchen nach Inkubation mit Doxorubicin und der neutralen Komet-Methode existiert eine Sudie von Shen et al. [189], deren Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit korellieren. Li et al. [113] präsentierten Ergebnisse mit linearer Konzentrationsabhängigkeit bei Behandlung von Spermatozoen der Maus mit Doxorubicin. Olive et al. [144] und Hazlehurst [80] publizierten Daten mit Etoposid als Topoisimerase II-Hemmer und fanden eine lineare Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit dem neutralen Komet-Assay. Beim Vergleich der zitierten Daten mit den eigenen Ergebnissen konnte eine qualitative Übereinstimung hinsichtlich der Kurvenverläufe der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen festgestellt werden.

Da keine Daten zur Detektion von Doppelstrangbrüchen mit dem neutralen Komet-Assay nach Exposition mit offenen Radionukliden recherchiert werden konnten, wird an dieser

Stelle ein kurzer Überblick über Publikationen zum neutralen Komet-Assay und externer Bestrahlung gegeben.

Die Ergebnisse von Müller et al. [132] verweisen auf einen starken Anstieg der DNA-Schäden in Lymphozyten bis 2,5 Gy Röntgenstrahlung. Diese Daten konnten mit den eigenen Versuchen weder mit dem Alpha-Emitter noch mit dem Beta-Emitter reproduziert werden (vgl. Abb. 13). Hier ist die Möglichkeit der Erfassung von Einzelstrangbrüchen nicht auszuschließen [24] (vgl. 4.3).

Dagegen zeigten Olive et al. [157] lineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen an murinen, leukämischen Lymphoblasten für Röntgenstrahlung im Dosisbereich von 0-100 Gy.

Weitere Daten zur Anwendung des neutralen Komet-Assays als Doppelstrangbruch-detektierende Methode nach Applikation von Röntgenstrahlung oder externer Gamma-Strahlung wurden publiziert [10, 99, 144, 146, 158, 219].

4.3.2 Vergleich der DNA-schädigenden Noxen

Initiale DNA-Schäden ^{211}At und ^{188}Re

Da die hohe lokale Energiedeposition von Alpha-Partikeln im Gegensatz zu einer niedrigeren lokalen Energiedeposition einen höheren Anteil an Doppelstrangbrüchen bewirkt, wurde für ^{211}At ein höheres Schädigungspotential als für ^{188}Re erwartet.

Mit dem neutralen Komet-Assay konnte bei der Darstellung der DNA-Schäden in Abhängigkeit von der Dosis die höhere biologische Wirksamkeit des Alpha-Strahlers ^{211}At gegenüber dem Beta-Strahler ^{188}Re bestätigt werden. Bei den Dosispunkten 20 Gy, 50 Gy und 100 Gy betrugen die Relationen der biologischen Wirkung 1,3 / 1,6 / 1,9. Im Gegensatz zum alkalischen Komet-Test verdeutlichte sich hier mit steigender Dosis die höhere biologische Wirkung von ^{211}At (siehe Tab. 21).

Initiale DNA-Schäden Doxorubicin

Für Doxorubicin konnte mit der neutralen Komet-Version ein nichtlinearer Anstieg der induzierten DNA-Schäden verzeichnet werden. Die DSB-induzierende Wirkung von Doxorubicin war mit der neutralen Komet-Variante nachzuweisen, da bei gleichen Konzentrationen höhere OTM-Werte gemessen wurden als im alkalischen Assay. In Bezug auf das Schädigungspotential von Doxorubicin wurde somit eine qualitativ ähnliche Wirkung wie für den Alphastrahler ^{211}At analysiert (bevorzugt DSB).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass mit dem neutralen Komet-Assay die Qualität der DNA-Schäden als DNA-Doppelstrangbrüche identifiziert werden konnten.

Die Messwerte für 10 Gy ^{188}Re und 20 Gy ^{211}At wurden als signifikant unterschiedlich von der unbestrahlten Kontrolle getestet (vgl. Tab. 14).

4.3.3 Reparatur der Initialschäden

Reparatur ^{211}At

Die Reparatur der Doppelstrangbrüche wurde experimentell über einen Zeitraum von vier Stunden bei 37 °C verfolgt.

Die in Abschnitt 3.2.2 (siehe Abb. 24) veranschaulichten Ergebnisse für ^{211}At weisen darauf hin, dass im untersuchten Zeitraum nach Bestrahlung mit 15 Gy und 30 Gy nur eine geringfügige Reparatur auf 75 % des Initialschadens erfolgte, während bei 50 Gy nahezu alle Doppelstrangbrüche unrepariert blieben. Nach einer Verlängerung der Reparaturzeit auf 20 h konnte keine weitere Rekonstitution der DNA-Schäden im Vergleich zum Niveau der 4 h-Werte beobachtet werden (vgl. Abb. 25).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DSB-Reparatur nach Applikation von ^{211}At fanden Pinto et al. [165] mit 100 Gy Alpha-Strahlung (^{238}Pu) an humanen Fibroblasten nach 24 h residuale DNA-Schäden von 85 % (PFGE). Die Ergebnisse der eingeschränkten Reparatur nach Alpha-Strahlung wurden von den Autoren mit der Induktion von LMDS (Locally Multiple Damaged Sites) erklärt.

Bei der Exposition von Zellen mit dem Hoch-LET-Emitter ^{211}At resultiert eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Entstehung von Doppelstrangbrüchen. Die Reparatur der DNA-Schäden, die auf Grund von Alpha-Strahlung entstehen, ist im Gegensatz zu Schäden nach Beta- oder Gamma-Strahlung komplexer, da Alpha-Partikel größere intragenische Deletionen verursachen können [165].

Reparatur ^{188}Re

Die Resultate der Reparaturkinetk der mit ^{188}Re bestrahlten Lymphozyten ergaben für 20 Gy nach 4 h zunächst eine deutliche Reduzierung des initialen Schadens auf 42 %, der nach 20 h jedoch wieder auf 71 % Restschaden anwuchs. Die höhere Dosis von 75 Gy ließ sowohl nach 4 h, als auch nach 20 h Reparaturinkubation eine Verringerung der DSB auf etwa 70 % des Ausgangsschadens zu (vgl. Abb. 24).

Die zunächst deutliche Reparatur nach 4 h auf etwa die Hälfte des Initialschadens konnte nach 20 h Reparaturzeit nicht bestätigt werden. Hilfreich bei der Diskussion dieses Ergebnisses könnten die Überlegungen sein, dass die DSB-Reparatur von verschiedenen Faktoren abhängen kann. Dazu gehören beispielsweise die Komplexität der Läsionen und die Zugänglichkeit der DSB für die Reparaturenzyme. Diese Vorstellungen werden dahingehend diskutiert, dass "simple" Läsionen schneller behoben werden können. Olive beschreibt die Möglichkeit, dass der Assay die Läsion als DSB detektiert, die Zelle jedoch einen Einzelstrangbruch erkennt und eine schnelle ESB-Reparatur initiiert [139, 179].

Banath et al. [10] publizierten Daten nach Bestrahlung von humanen Lymphozyten mit 75 Gy Röntgenstrahlung. Nach 24 h blieben signifikante residuelle DSB auf einem Niveau von 32 %

(neutraler Komet-Assay). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den eigenen Ergebnissen sowohl für 75 Gy bei ^{188}Re bei als auch bei ^{211}At.

Da die zitierten Ergebnisse von Banath et al. [10] mit einem abweichenden Komet-Assay-Protokoll erzielt wurden und eine andere Strahlenqualität verwendet wurde, könnten diese Tatsachen Ursachen für die abweichenden Ergebnisse sein. Interessanterweise stimmte die Reparaturkinetik für Röntgenstrahlung mit einem leichten Anstieg der DNA-Schäden nach 2 h-4 h Reparaturzeit mit den Kinetiken für ^{211}At und ^{188}Re überein.

Für die Anwendung des neutralen Komet-Assays zur Detektion von DSB und deren Reparatur nach Bestrahlung mit offenen Radionukliden existieren keine Arbeiten. Ergebnisse für externe Strahlenquellen wurden publiziert [136, 168, 199, 219].

Olive et al. [157] zeigten beispielsweise für 50 Gy Röntgenstrahlung bei murinen, leukämischen Lymphoblasten eine Reparatur der DSB nach 2 h auf 50 % des Initialschadens. Hier ist eine Übereinstimmung mit der Reparaturkapazität nach Bestrahlung mit ^{188}Re der eigenen Versuche interpretierbar.

Doxorubicin

Die nachgewiesene Inhibierung der DNA-Reparatur durch Inkubation der Lymphozyten mit Doxorubicin (vgl. Abb. 26) auf 50 %-80 % residuelle DNA-Schäden nach 4 h erfolgte analog den Ergebnissen des alkalischen Komet-Assays mit inverser Korrelation zur Doxorubicin-Konzentration. Die Feststellung der unvollständigen Reparatur der erzeugten DNA-Schäden sowohl 4 h als auch nach 20 h Reparaturzeit entspricht den Vorstellungen von der Komplexität der DSB-Reparatur (vgl. 4.3.3 ^{211}At) nach Exposition mit DSB-induzierenden Agenzien.

Einer der Gründe für die unerwartete effektivere Reparatur bei höherer Dosierung von Doxorubicin könnte die Annahme einer schnellen Reparatur bei hohen Konzentrationen mit der nichthomologen Verknüpfung der Enden (NHEJ) sein. NHEJ lässt sich als eine Art "Erste Hilfe Reparatur" beschreiben, bei der zwei nebeneinander liegende DNA-Enden verbunden werden ohne Beachtung der korrekten Zusammengehörigkeit. Für die homologe Rekombination ist die Verwendung von homologen Sequenzen charakteristisch, die mit einem präzisen jedoch langsameren Mechanismus als NHEJ abläuft (vgl. 1.4). So diskutierten die Autoren in [77], dass die homologe Rekombination komplizierte DSB repariert, deren Beseitigung mit dem NHEJ nicht erfolgreich verlief. Andere Ansätze zur Diskussion der DSB-Reparatur vertreten Iliakis und Wang [87] mit der These, dass zunächst alle Doppelstrangbrüche mit NHEJ rekonstituiert werden und diese DNA-Abschnitte durch bestimmte Proteine als temporärer Zustand gekennzeichnet werden. Im Anschluss an diese Kennzeichnung soll nach Ansicht der Autoren eine Überarbeitung der nichthomologen Endverknüpfung durch die homologe Rekombination erfolgen.

Die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin ist wie bereits beschrieben die Hemmung des Enzyms Topoisomerase II, dessen Aufgabe die Änderung der Topologie, d.h. des Verdrillungsgrades der DNA ist. Dabei werden vorübergehend beide DNA-Stränge durchtrennt [114]. Die Untersuchung des Reparaturverhaltens in den Experimenten der vorliegenden Arbeit erfolgte nach Entfernung des Doxorubicins aus der Zellsuspension, wodurch die Hemmung der Topoisomerase II Aktivität aufgehoben wird. Dieser Mechanismus könnte bei kleineren Doxorubicin-Konzentrationen zu einer effektiveren Initiierung der Reparaturmechanismen führen, die zunächst (4 h) in der enzymatischen Induktion von DSB resultieren [16]. Einen Hinweis auf temporäre Zustände geben die 20 h-Werte, die unabhängig von der Doxorubicin-Konzentration einen hohen, jedoch nahezu einheitlichen Anteil (ca. 60 %) von restlichen Doppelstrangbrüchen nach längerer Erholungsphase belegen.

Wie beim alkalischen Komet-Assay konnten bei der mikroskopischen Auswertung apoptotische Zellen beobachtet werden, deren Anzahl einen dramatischen Anstieg nach der Reparaturzeit von 20 h zeigte. Vergleicht man die semiquantitative Auswertung der Apoptoseraten (Anzahl / 100 ausgewerte Zellen) im Komet-Assay wurde mit Doxorubicin die höchste Apoptoserate erzeugt, gefolgt von ^{211}At, während bei ^{188}Re deutlich weniger Apoptosen gezählt wurden.

Zur Untersuchung der Reparaturkapazität mit dem neutralen Komet-Assay nach Inkubation von Zellen mit Doxorubicin wurde eine Publikation gefunden. Shen et al. [189] konnten bis 36 h nach Inkubation mit Doxorubicin keine Reparatur der DNA-Schäden feststellen, nach 48 h war jedoch eine nahezu vollständige Reparatur nachzuweisen. Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit den Ergebnissen der eigenen Experimente. Als Ursachen können andere Bedingungen bei der Lyse und Elektrophorese des neutralen Komet-Assays benannt werden, sowie die diskutierte Apoptoserate nach Langzeitreparatur mit dem Verlust dieser Zellen vor Durchführung der Komet-Analyse.

Als zusammenfassende Betrachtung der Untersuchungen zur Reparaturkinetik mit dem neutralen Komet-Assay und Doxorubicin können eine verminderte Reparaturkapazität und ein hoher Residualschaden nach 20 h festgehalten werden.

Vergleich der Reparatur nach Applikation von ^{211}At, ^{188}Re und Doxorubicin

Vergleicht man die Residualschäden nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re bei niedrigen Dosen (15 Gy bzw. 20 Gy) nach einer Reparaturzeit von vier Stunden ist bei ^{211}At nur eine eingeschränkte Reparatur (70 %) messbar, bei ^{188}Re dagegen wurde über die Hälfte der DNA-Schäden repariert. Bezieht man Doxorubicin in den Vergleich ein, so sind nach 4 h Reparatur die Residualschäden auf einem ähnlichen Niveau mit ^{211}At, während nach 20 h kaum Unterschiede zwischen Doxorubicin, ^{211}At und ^{188}Re existieren (vgl. Abb. 27).

Die Betrachtung der Reparaturkinetiken nach Exposition von Lymphozyten mit den beiden Strahlenqualitäten ^{211}At und ^{188}Re weist auf den Zusammenhang von Linearem Energietransfer und der Komplexität der DNA-Schäden hin, da für ^{211}At insgesamt ein höherer Anteil residualer DSB verblieb (vgl. Abb. 25). Theoretische Betrachtungen dazu beschreiben den Zusammenhang von LET und DNA-Reparatur. So vertreten Pinto et al. [165] die These, dass durch Niedrig-LET-Strahlung erzeugte Doppelstrangbrüche schneller repariert werden als DSB nach Hoch-LET Strahlung. Ein vermindertes Reparaturvermögen durch eine Steigerung der Komplexität der Läsionen korrelieren mit dem Anstieg des LET [139, 179]. Diese These kann mit den eigenen Ergebnissen gestützt werden, da die DSB nach Exposition mit ^{188}Re zumindest nach 4 h Reparaturzeit mit höherer Effektivität beseitigt wurden als die DSB nach ^{211}At.

Insgesamt kann für die DNA-schädigenden Noxen festgestellt werden, dass nach 4 h Erholungszeit eine verminderte Reparaturkapazität nach Bestrahlung von Lymphozyten mit dem Hoch-LET-Emitter ^{211}At im Vergleich zu ^{188}Re gezeigt werden konnte und nach 20 h Reparaturzeit die Residualschäden eine ähnliche Höhe erreichten.

4.4 Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie

Durch die Immunfluoreszenz-Methode mit der Darstellung von γ-H2AX-Foci wird eine deutliche Erhöhung der Sensitvität der DSB-Quantifizierung erreicht. Andererseits ist die Spezifität durch die indirekte Messung des DNA-Schadens (Phosphorylierung) bei der Immunfluoreszenz-Methode geringer als beim Komet-Assay, der alkalischen Elution oder der PFGE [66]. Zahlreiche Arbeitsgruppen interpretieren die Bildung der Gamma-H2AX-Foci als Kolokalsierungsereignisse zur DSB-Induktion [57, 142, 172, 185, 187]. Die Quantifizierung der DSB-Induktion und deren Reparatur wird häufig durch Zählen der Gamma-H2AX-Foci realisiert [175, 186]. Obwohl die Auffassung der Korrelation zwischen der Anzahl der DSB und der Zahl der Gamma-H2AX-Foci allgemeine Akzeptanz erfährt, wird die Frage des Zusammenhangs zwischen dem Verschwinden der nukleären Foci und der DSB-Reparatur kontrovers diskutiert [23].

Auf eine mögliche Korrelation zwischen zellulärer Radiosensitivität und der Anzahl residualer Foci relativ lange Zeit nach der Bestrahlung wird in zahlreichen Studien verwiesen [118, 148, 176, 197, 224]. Dessen ungeachtet besteht noch Klärungsbedarf hinsichtlich der Dosisabhängigikeit der Anzahl verbleibender Foci und dem Zeitfenster nach Bestrahlung [121].

In den letzten fünf Jahren wurden umfangreiche Anwendungen zur Untersuchung der Zytotoxizität [3, 7, 59, 126, 161, 163, 200] bzw. zum Vergleich von Zytotoxizität und Radiotoxizität [104, 129], der Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie an verschiedenen biologischen Testsystemen [66, 138, 171] vorgestellt.

Sedelnikova und Mitarbeiter [187] etablierten die quantitative Beziehung zwischen dem Zerfall des Radionuklids ^{125}I als [^{125}I]-IdU, der Anzahl der DSB und der phosphorylierten H2AX-Foci mit dem Resultat, dass ein Zerfall einen Doppelstrangbruch induziert und dieser als ein nukleärer Focus erscheint.

Das Vorhandensein des Histons H2AX ist bei der DNA-Reparatur über die Reparaturmechanismen (NHEJ und HR) zwar nicht essentiell, eine Modulation der Mechanismen wurde jedoch beschrieben [56]. Die biochemischen Reaktionen sind teilweise noch unbekannt, gesichert ist die unterstützende Beteiligung der γ-H2AX-Komplexe über eine lokale Konzentration der Reparaturfaktoren sowie die Verhinderung der vorzeitigen Abtrennung von Bruchstücken und damit der Vermeidung von Chromosomenveränderungen [56]. Die Aufrechterhaltung eines Restschadens nach der Reparatur ist in der Regel auf die Gegenwart von unreparierten oder unkorrekt reparierten DSB zurückzuführen, andererseits kann die H2AX-Phosphorylierung ebenso von der Aktivität verschiedener Kinasen und Phosphatasen sowie von Histon remodulierenden Prozessen abhängen [152].

Olive et al. [152] führten Studien zur intrinsischen Strahlensensitivität an Lymphozyten von Patienten nach Prostata-Brachytherapie durch, um die These der Eignung der DNA-Reparaturkapazität als eine Hauptdeterminante zur Feststellung der individuellen Strahlenempfindlichkeit zu überprüfen. Von zwei Patientengruppen wurden periphere mononukleäre Zellen in vitro bestrahlt und die residualen γ-H2AX-Foci korrelierten wenig mit dem Toxizitätsscore beider Gruppen [152].

Zur interindividuellen Varianz gibt es Versuche von Hamasaki et al. an Lymphozyten [75]. Die strahleninduzierten γ-H2AX Level waren signifikant unterschiedlich bei allen nach der Bestrahlung untersuchten Zeitpunkten (1 h, 2 h, 6 h, 24 h). Die Autoren untersuchten zudem die Bedeutung der individuell unterschiedlichen Lymphozyten-Subpopulationen und kamen zu dem Resultat, dass individuelle Unterschiede in der strahleninduzierten Gamma-H2AX-Expression nicht auf die individuellen Proportionen der T-Zell-Subpopulationen ($CD4^+$ und $CD8^+$) zurückzuführen sind.

Die Mehrzahl aller Experimente zur DSB-Detektion mit Gamma-H2AX wird immunzytochemisch mit Auswertung am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, angewandt wird auch die Auswertung mit Durchflusszytometrie [11, 12, 75, 148, 153]. Automatische Analysesysteme zur Zählung der Foci wurden von Leatherbarrow [109] und Costes [38] vorgestellt. Ebenfalls von Costes et al. wurde die zweidimensionale Auswertetechnik mit der dreidimensionalen verglichen und keine qualitativen Unterschiede festgestellt [38].

Anwendungen zur Untersuchung der Radiotoxizität von offenen Radionukliden sind kaum beschrieben und in den folgenden Diskussionspunkten erwähnt (4.4.1 und 4.4.2).

Zahlreiche Arbeiten gibt es hingegen zur Applikation von Röntgenstrahlung auf Cervix-Karzinomzellen Banath et al. [11], Olive et al. [148], anderen Karzinomzellen [9, 118] und

Normalzellen [1, 28, 74, 90] sowie Studien mit humanen Lymphozyten in vivo und in vitro [41, 75, 106, 115, 119, 183]. Zur Testung der Zytotoxizität von Chemotherapeutika sind zahlreiche Publikationen bekannt [12].

4.4.1 Effekte nach Bestrahlung mit ^{211}At

Die Bestrahlungsversuche an Lymphozyten mit ^{211}At wurden im Dosisbereich von 0,05 Gy bis 1,0 Gy mit Reparaturzeiten von 10 min, 2 h sowie 24 h untersucht. Bei höheren Dosen trat eine Sättigung der γ-H2AX-Foci-Induktion ein bzw. die optische Auflösung der einzelnen Foci war nicht mehr gegeben.

Im Bereich bis 1 Gy wurden lineare Dosis-Wirkungs-Kurven gefunden, wobei die 10 min-Kurve den steilsten Anstieg aufwies. Die Induktion der γ-H2AX-Foci folgte nach Bestrahlung mit ^{211}At einer schnellen Kinetik.

Eine Verdopplung der Intensität und Größe der Foci innerhalb von 2 h nach Bestrahlung beschrieben Costes und Mitarbeiter [38] für Hoch-LET-Stickstoff-Ionen mit einer Dosis von 0,3 Gy. Die Kinetik der Dosis-Wirkungs-Kurve (0,05 Gy, ^{211}At) der eigenen Experimente zeigte übereinstimmend innerhalb von 2 h eine Verdopplung der Anzahl der Foci.

Die Verteilung der Foci im Zellkern war durch die für Hoch-LET-Emitter charakteristischen Tracks gekennzeichnet, die auf der hohen lokalen Energiedeposition beruht. Nach 24 h wurden die nukleären Foci bis auf einen Restschaden repariert, dessen Ausmaß mit der Dosis korrelierte.

Studien zur Detektion von γ-H2AX-Foci mit Hoch-LET-Emittern (HZE-Partikel) existieren von Desai et al. [45]. Leatherbarrow et al. [109] beschreiben in ihren Ergebnissen bezüglich der Reparatur der Doppelstrangbrüche nach 1 Gy Alpha-Strahlung einen Restschaden von 20 % nach der Reparaturzeit von 6 Stunden. Die eigenen Daten ergaben übereinstimmend, dass nach 24 h die Anzahl der nukleären Foci auf 22 % des initialen Schadens verringert wurden.

Karlsson et al. [93] zeigten, dass die Fraktion unreparierter Foci nach 24 h bei Hoch-LET-Stickstoff-Ionen (125 keV/µm) höher ist als nach Niedrig-LET-Photonenstrahlung. Dies korreliert mit den eigenen Ergebnissen beim Vergleich der Anzahl der residualen Gamma-H2AX-Foci nach Bestrahlung mit ^{211}At und mit ^{188}Re nach 24 h (vgl. Abb. 31). Bezog man den Residualschaden auf die Anzahl der induzierten Foci, blieb unabhängig von der Strahlenqualität der gleiche Anteil Residualschäden in der Zelle.

4.4.2 Effekte nach Bestrahlung mit ^{188}Re

Um die Wirkung von ^{188}Re als Beta-Strahler hinsichtlich der Fähigkeit zur Induktion von Doppelstrangbrüchen zu untersuchen, wurde im Dosisbereich von 0,5 Gy bis 5,0 Gy gearbeitet. Während ab der Dosis von 5 Gy wurde ein Sättigungseffekt der γ-H2AX-Foci-Induktion gefunden wurde, konnte bis 5 Gy eine lineare Abhängigkeit der gezählten Foci von der Dosis ermittelt werden.

Die Anstiege der 10 min-Kurve und der 2 h-Kurve zeigten ähnliche Verläufe und damit eine verzögerte Kinetik der Foci-Induktion im Vergleich zu ^{211}At.

Nach 2 h Reparaturzeit war bei allen Dosispunkten noch keine Abnahme der Anzahl der γ-H2AX-Foci zu erkennen, sondern noch ein geringer Anstieg im Vergleich zu der 10 min-Kurve zu beobachten (vgl. Abb. 33). Ein Reparatureffekt konnte 4 h nach Bestrahlung nachgewiesen werden, der sich bis 24 h nach Bestrahlung auf ein dosisabhängiges Restschadenniveau fortsetzte.

Zur Anwendung der DSB-Detektion mit γ-H2AX-Immunfluoreszenz mit Beta-Emittern wurden bei aktuellen Literaturrecherchen keine Daten gefunden.

Von Costantini [37] et al. wurde an Mammakarzinomzellen mit ^{111}In-Trastuzumab (Herceptin) ein höheres Potential zur Induktion von DNA-Schäden als für den unmarkierten Antikörper mit γ-H2AX-Immunfluoreszenz nachgewiesen (Auger-Elektronen). Panyutin et al. [160] und Sedelnikova [186] et al. wendeten die Detektion von DSB mit der γ-H2AX-Immunfluoreszenz zur Quantifizierung des intrazellulären DNA-Schadens bei Antigen-Radiotherapie an. Fazit war die Anwendbarkeit bei Testung von ^{125}I-markierten DNA-Target-Molekülen.

4.4.3 Einfluss von Doxorubicin

Die Detektion der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin wurde durch Inkubation der Lymphozyten bei 37 °C mit verschiedenen Konzentrationen (0,17-68 µM) durchgeführt.

Eine Abhängigkeit der Bildung der γ-H2AX-Foci von der Konzentration zeigt die Abb. 34. Es bestand ein biphasischer Kurvenverlauf mit einem linearen und einem nicht linearen Teil, da ab 17 µM eine Sättigung des Messsignals eintrat. Kurz nach dem Inkubieren der Zellen mit Doxorubicin (10 min) wurde die geringste Anzahl Foci/Zelle gezählt. Die 2 h- und 4 h-Werte zeigten, dass die Bildung der γ-H2AX-Foci bei allen Konzentrationen noch andauerte. Damit unterschied sich die Kinetik der Schadensentwicklung von der Kinetik, die für die Radionuklide ermittelten wurde.

Beim Auswerten der Zellen am Fluoreszenzmikroskop fiel eine starke Heterogenität der Schadeninduktion auf (Zellen mit Foci und Zellen ohne Foci), die zudem konzentrationsabhängig war. Bei der Lokalisation der Schäden zeigten sich diffuse und ubiquitäre Foci,

wobei der einzelne nukleäre Focus eine geringere Fluoreszenzintensität und geringere Durchmesser als die Foci von ^{188}Re und ^{211}At aufwiesen. Zellkerne mit extrem hoher Fluoreszenzintensität deuteten auf Apoptoseinduktion durch Doxorubicin hin.

Kurz und Mitarbeiter [105] inkubierten humane lymphoblastoide Zellen mit Doxorubicin (1µM) über 2 h und bestimmten einen Anteil Gamma-H2AX positiver Zellen von 90 % bezogen auf alle analysierten Zellen. Dies entspricht annähernd den eigenen Daten für 1,0 µg/ml=1,7 µM (86 %).

Studien zur Untersuchung des biochemischen Wirkmechanismus und der kardiotoxischen Eigenschaften wurden von Lyu et al. [117] mit der Detektion von γ-H2AX anhand Western Blot Analyse durchgeführt. Die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin wurde durch die Bildung nichtkovalenter DNA-Komplexe unter Beteiligung von Topoisomerase II erklärt [117].

Banath und Olive [12] beschrieben Doxorubicin als DSB-induzierendes Agenz und untersuchten die Korrelation zwischen klonogenem Überleben und der Detektion von DSB mit γ-H2AX. Bei der Doxorubicin-Konzentration von 2 µM überlebten etwa nur 10 % der V79-Zellen (Chinese hamster) und die relative γ-H2AX Fluoreszenzintensität stieg im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 9 an (FACS). Die eigenen Versuche zeigten vergleichbare Ergebnisse (Faktor 8,1) bei entsprechender Konzentration (vgl. Abb. 37).

Von Rogakou et al. [173] wurde mit Etoposid und Staurosporin nachgewiesen, dass die Expression von γ-H2AX zum einen mit der Induktion von DSB korreliert (Filterelution, PFGE, TUNEL-Assay) und andererseits Caspasen aktiviert werden, die spezifisch für den apoptotischen Zelltod sind. Ähnliche Ergebnisse publizierten Rebbaa et al. [170] für die Doxorubcin-induzierte Caspase-3 Expression in humanen Neuroblastomzellen bei simultanem Nachweis von Doppelstrangbrüchen mit Gamma-H2AX. Mit steigender Konzentration von Doxorubicin stieg die Fluoreszenzintensität in den γ-H2AX-positiven Zellen an.

Dieses morphologische Phänomen wurde bei Lymphozyten und höheren Doxorubicin-Konzentrationen (ab 1,7 µM) in den eigenen Auswertungen beobachtet. Da in diesen stark fluoreszierenden Zellen die optische Auflösung der einzelnen Foci nicht mehr gewährleistet war, wurden diese von der Auswertung ausgeschlossen. Eine andere Ursache für die hohe Fluoreszenzintensität bei höheren Doxorubicin-Konzentrationen ist die Eigenfluoreszenz des Zytostatikums und daraus resultierend die Abhängigkeit des Fluoreszenzemissions-spektrums von der Doxorubicin-Konzentration [94].

In Bezug auf die eigenen Experimente kann zusammengefasst werden:

- Es bestand eine nahezu lineare Abhängigkeit der γ-H2AX-Induktion bis zur Konzentration von 17 µM. Bei 68 µM trat eine Sättigung des Messignals ein bzw. die Zellen gingen in Apoptose.
- Die Phosphorylierung verlief mit deutlich verzögerter Kinetik im Vergleich zu ^{211}At und ^{188}Re. Mit steigender Doxorubicin-Konzentration stieg die Induktionszeit bis zum Erreichen der maximalen Anzahl von γ-H2AX-Foci an.
- Nach 24 h Reparaturzeit blieben 50 %-75 % der DSB in Korrelation zur Doxorubicin-Konzentration unrepariert.

4.4.4 Vergleich der DNA-schädigenden Noxen

Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen sind für die beiden Radionuklide sowie für Doxorubcin vergleichbar, mit einem linearen Bereich und Eintreten eines Sättigungseffektes nach hohen Dosen der DNA-schädigenden Noxen. Hinsichtlich der Kinetik der γ-H2AX-Foci-Induktion wurden Unterschiede zwischen den Noxen festgestellt. Die Induktion der γ-H2AX-Foci folgte nach Bestrahlung mit ^{211}At einer schnellen Kinetik (10 min), bei ^{188}Re erreichte die Induktion der Foci dagegen nach 2 h das Maximum. Die Etablierung messbarer γ-H2AX-Foci nach Behandlung mit Doxorubicin verlief mit 4 h am langsamsten. Die Ursache dafür könnte die zeitverzögerte Zunahme der Doxorubicin-induzierten DSB sein [51].

Für den Vergleich der biologischen Wirksamkeit der Strahlenqualitäten wurde die Anzahl der γ-H2AX-Foci nach 10 min, 2 h und 24 h Reparaturzeit für ^{211}At und ^{188}Re bei gleichen Dosen (0,5 Gy und 1,0 Gy) herangezogen. Für jeden Zeitpunkt nach Bestrahlungsende und jede Dosis wurde eine höhere Wirkung des Alpha-Emitters gefunden (siehe 4.6, Tab. 22). Das Verhältnis ^{211}At/^{188}Re verkleinert sich in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit nach Bestrahlung.

Die Arbeitsgruppen um Leatherbarrow [109], Costes [38] sowie Karlsson [93] fanden ähnliche Ergebnisse beim Vergleich von Hoch-LET- mit Niedrig-LET-Emittern. Die höhere biologische Wirksamkeit der Hoch-LET-Ionenstrahler beruht nach Auffassung der Autoren auf der verminderten Reparatur der multiplen DNA-Schäden [6].

Der Vergleich des Reparaturverhaltens der Lymphozyten nach Exposition mit ^{211}At und ^{188}Re nach 24 h Reparaturzeit ermittelte keine Unterschiede im Residualschaden der mit ^{211}At oder ^{188}Re bestrahlten Zellen (vgl. Abb. 41). Dieses Ergebnis reflektierte nicht die höhere biologische Wirkung des Alpha-Strahlers, die eine verminderte Reparatur der DSB vermuten ließ. Auch im Vergleich mit dem neutralen Komet-Assay traten in Bezug auf die Doppelstrangbruchreparatur Widersprüche auf, da mit der Komet-Methode höhere Residualschäden detektiert wurden als mit γ-H2AX-IFM: ^{211}At: 67 % vs. 22 % sowie ^{188}Re

70 % vs. 26 %. Diese Ergebnisse beruhen jedoch auf unterschiedlichen Dosisbereichen, die durch die Sensitivität der Teste bedingt ist, und stellen einen limitierenden Faktor bei der Interpretation der Daten dar. Die Diskussion zum Vergleich der Reparaturergebnisse erfolgt in Abschnitt 4.6 dieser Arbeit.

Morphologisch zeigte ein Teil der mit ^{211}At-behandelten Zellen nach 24 h etwa 2-fach größere Einzelfoci als mit ^{188}Re-behandelte Zellen. Dadurch könnte bei ^{211}At eine Unterschätzung der Focianzahl und damit des Residualschadens nach 24 h erfolgt sein. Einen Anstieg der Focusgröße nach Bestrahlung mit Hoch-LET-Emittern im Vergleich zu Niedrig-LET-Strahlern wurden von Costes et al. [38] und Karlsson et al. [93] beschrieben. Obwohl eine Quantifizierung der Fläche der phosphorylierten Histone mit dem für die eigenen Arbeiten verwendeten Mikroskop nicht möglich war, kann auf Grund der qualitativ-visuellen Beobachtungen eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Autoren formuliert werden.

Die Zellkerne, die mit ^{211}At bestrahlt wurden, wiesen die für Alpha-Emitter typischen Tracks auf, die die Schäden entlang der Teilchenspur repräsentieren. Eine optische Auflösung der Einzelfoci war mit steigender Dosis nicht mehr möglich, was auf die lokale Konzentration der DSB (Cluster) hinwies. Von multiplen Schäden bzw. DNA-Schäden in Form von „Clustern“ nach Hoch-LET-Strahlung wurde übereinstimmend berichtet [5, 93]. Damit unterschied sich das Schädigungsmuster deutlich von dem mit ^{188}Re induzierten Muster der Foci, die über den gesamten Zellkern verteilt waren. Unter dem Einfluss von Doxorubicin war ein Schädigungsmuster mit geringerer Fluoreszenzintensität des Einzelfocus und einer homogenen Verteilung über den gesamten Zellkern erkennbar.

4.5 Annexin V-FITC/PI-Durchflusszytometrie

Die Entdeckung von Apoptose und Nekrose als zwei genetisch, biochemisch und morphologisch differente Arten des Zelltodes in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Strahlendosis beruhen auf den Erkenntnissen von Kerr, Wyllie und Currie [98, 226].

Die Apoptosebestimmung über die Bindung von Annexin V an das von der Zellmembraninnenseite zur –außenseite translozierte Phospholipid Phosphatidylserin (PS) wurde von Vermes et al. im Jahr 1995 [208] publiziert. Die älteren Methoden zur Apoptosemessung wie z.B der DNA-Leiter (DNA-Ladder-Assay) und der TUNEL-Assay wurden als wenig spezifisch und zeitaufwändig charakterisiert [208]. Weitere Arbeitsgruppen berichten in Studien von einer guten Reproduzierbarkeit, sowie hoher Sensitivität und Spezifität der Annexin V/PI-Durchfusszytometrie [79, 82, 122, 162].

Das Prinzip der PS-Translokation in apoptotischen Zellen kann zur in vivo Darstellung der betreffenden Zellen genutzt werden. So wurde von Blankenberg et al. die Präparation und

Anwendung von ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V beschrieben [18]. Weitere Arbeiten berichten über die Markierung von Annexin V mit ^{124}I und ^{125}I [31, 95], ebenso wurden Daten zu in vivo Experimenten mit ^{18}F-Annexin V von Murakami et al. [134] publiziert. Weiterhin ist es möglich Annexin V mit ^{123}I zu markieren [231].

Anwendungen der Annexin V/PI-Durchflusszytomerie zur in vitro Testung der Zytotoxizität von DNA-schädigenden Noxen verwenden Lymphozyten als biologisches Testsystem [120]. Methodische Aspekte studierten Goldberg et al. [69] mit der Substitution von radioaktiven Testen (^{51}Cr) und einer daraus resultierenden Erhöhung der Sensitivität der Apoptose-bestimmungen.
Ergebnisse zur Induktion und Detektion von Apoptose/Nekrose nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und externer Gamma-Strahlung publizierten die Arbeitsgruppen Wilkins et al. [217], Hertveldt et al. [85] Vermes et al. [208] und Kern et al. [97].

4.5.1 Einfluss von ^{211}At auf die Apoptoseinduktion

Eine Möglichkeit zum Nachweis der Radiotoxizität von ^{211}At an Lymphozyten stellt die Detektion der Apoptoserate mit der Annexin V/PI-Durchflusszytometrie dar.
Es wurden dazu die Dosis-Wirkungs-Beziehungen im Dosisbereich von 2 Gy bis 10 Gy und der Zeitverlauf der Apoptoseinduktion untersucht.
In proliferierenden Zellen ist die Apotoseinduktion ein zügig ablaufender Prozess (6 h), in G_0 Phase Zellen benötigt dieser Mechanismus eine deutlich längere Zeit (>12 h) [85]. So setzte bei Lymphozyten der apoptotische Prozess erst 24 h nach Bestrahlung ein, mit einer weiteren Verdopplung der apoptotischen Population nach 48 h [85]. Diese Zeitfenster wurden im Versuchsdesign der vorliegenden Arbeit verwendet und die eigenen Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen der Autoren (vgl. Abb. 44 und Abb. 47).
Zunächst wurde die Population der Annexin V-positiven Zellen (A^+/PI^-) untersucht. Kurz nach Bestrahlungsende (1 h) war eine niedrige Apoptoserate detektierbar, die mit steigender Dosis zunahm (vgl. Abb. 43). Nach 24 Stunden stieg der Anteil apoptotischer Zellen deutlich an, eine Dosiskorrelation existierte von 5 Gy bis 10 Gy. Zwei Tage (44 h) nach Bestrahlung konnte ein dezenter Rückgang beobachtet werden, eine Ausnahme bildete das Ergebnis bei 5 Gy mit einem extremen Abfall des Apoptoseindexes. Erklärt werden kann dies damit, dass für diese Zellen sofort ein Übergang in den spätapoptotischen Zustand eingeleitet wurde (Abb. 44). Bei weiterer Dosissteigerung auf 7,5 Gy und 10 Gy wurden entgegen den Erwartungen weniger spätapoptotische/nekrotische (A^+/PI^+) Zellen gemessen als nach 5 Gy (Abb. 44) und gleichzeitig jedoch eine höhere Rate frühapoptotischer (A^+/PI^-) Zellen (Abb. 43) gefunden.

Die Ergebnisse der ^{211}At-Versuche sollten im Kontext mit dem unterschiedlichen Zeitverlauf der Apoptoseinduktion in Bezug auf die Subpopulationen der PBMC diskutiert werden. Wie im Ergebnisteil unter 3.5.1 bereits beschrieben, besteht die Möglichkeit des Einflusses der unterschiedlichen Strahlensensibilität der Lymphozytensubpopulationen. Bei empfindlichen Zellen könnte vor der Messung der Zelltod eingetreten sein, während strahlenresistentere Zellen einem verzögerten Zeitverlauf der Apoptoseinduktion unterlagen.
Insgesamt konnten für die Versuche mit ^{211}At widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation der Dosis mit der biologischen Wirkung detektiert werden. Die Dosisabhängigkeit beschränkte sich auf die 1 h-Reihe und die 24 h-Reihe ab 5 Gy bei rein apoptotischen (Annexin V-positiven) Zellen. Der Einfluss des Alpha-Strahlers bewirkte offenbar Effekte in der zellulären Signaltransduktion, die mit der Messung der Apoptoseprozesse über Annexin V/PI nicht erklärt werden können. Weiterhin kann der gewählte Dosisbereich als Möglichkeit für Sättigungseffekte benannt werden, da bei Dosen >2 Gy biologische und methodische Limitationen auftraten.
Eine Steigerung der Apoptoseraten hinsichtlich des Zeitverlaufs nach Bestrahlung konnte bei Annexin V-positiven Zellen nach 24 h im Vergleich zu 1 h gemessen werden und für die Population der spätapoptotischen/nekrotischen Zellen nach 44 h im Vergleich zu 24 h.

Zur Einordnung der eigenen Ergebnisse in einen Kontext mit Untersuchungen zur biologischen Wirkung von Alpha-Emittern können die Arbeiten von Vandenbulcke et al. [207] herangezogen werden. Die Testung der Radiotoxizität von ^{213}Bi wurde durch Exposition von Lymphozyten (Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie, CLL) mit 2 Gy ^{213}Bi realisiert [207]. Nach 24 h betrug die Apoptoserate 26 %-30 % für 2 Gy ^{213}Bi. In eigenen Experimenten wurden mit 2 Gy ^{211}At bereits 47 % apoptotische PBMC nach 24 h gemessen. Die Ursache für die Diskrepanz könnte im Unterschied der Zellpopulationen (B-Zellen, CLL-Patienten versus mononukleäre Zellen, Normalspender) liegen.
Weitere Beispiele existieren zur Untersuchung der Wirksamkeit Alpha-Partikel-markierter Antikörper an verschiedenen Zellsystemen [15, 40, 112]. Ergebnisse, die sich auf Vergleiche zwischen der Wirksamkeit von Alpha- und Beta-Emittern beziehen, werden in 4.5.3 diskutiert.
Zusammenfassend betrachtet kann eine zufrieden stellende Korrelation zu den Daten für Alpha-Strahler vermerkt werden.

4.5.2 Einfluss von ^{188}Re auf die Apoptoseinduktion

Vergleichende Untersuchungen mit ^{188}Re sollten wie bei den ^{211}At-Versuchen Dosis-Wirkungs-Beziehungen im Dosisbereich von 2 Gy bis 15 Gy erstellen und den Zeitverlauf der Apoptoseinduktion analysieren.
Eine Stunde nach Bestrahlung mit ^{188}Re wurden kaum messbare erhöhte Anteile sowohl frühapoptotischer Lymphozyten (A^+/PI^-) gefunden. Der Anteil dieser apoptotischen Zellen stieg nach 24 h deutlich an (10 Gy, 34 %), zudem war eine Beziehung zwischen der Apoptoserate und den applizierten Dosen ersichtlich (vgl. Abb. 46). Am zweiten Tag (44 h) nach Bestrahlung wurde ein weiterer Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen gefunden (10 Gy, 40 %), der wiederum mit der Dosis korrelierte (vgl. Abb. 46).
Der Anteil doppelt gefärbter Zellen (A^+/PI^+) war nach 24 h kaum messbar (<3 %) nach 44 h erfolgte ein Anstieg auf 14 % bei Applikation von 10 Gy.

In der Literatur liegen kaum Daten zur Apoptoseinduktion mit Beta-Emittern vor, auf eine Publikation von Wei et al. [214] kann verwiesen werden, die allerdings nur einen bedingten Vergleich mit den eigenen Daten zulässt (Zelluptake, andere Zellart). Die Arbeitsgruppe führte Experimente mit dem Beta-Strahler ^{131}I durch und verglich die induzierten Apoptoseraten nach Exposition mit ^{131}I und mit ^{131}I-Rituximab an Raji-Zellen. Die Inkubation mit ^{131}I-Rituximab bewirkte 52 % Apoptoserate, nach Behandlung der Zellen mit ^{131}I ohne Antikörper betrug der Apoptoseindex 42,7 % [214]. In erster Näherung könnte eine Übereinstimmung mit dem Apoptoseindex der mononukleären Zellen von 34 % nach 10 Gy ^{188}Re formuliert werden.
Interessante Vergleiche zwischen Alpha- und Beta-Strahlern werden im Zusammenhang mit den ^{211}At- und ^{188}Re-Daten der eigenen Versuche vorgestellt und diskutiert (vgl. 4.5.3).

4.5.3 Vergleich von ^{211}At und ^{188}Re

Um den Einfluss der Strahlenqualität auf die Apoptoseinduktion zu beurteilen, wurden die Ergebnisse der Exposition von Lymphozyten mit ^{211}At und ^{188}Re gegenübergestellt. Dazu wurden die Messungen bei jeweils drei Dosispunkten der Radionuklide miteinander verglichen. Das Diagramm (Abb. 48) veranschaulicht die Ergebnisse für die apoptotischen (A^+/PI^-) Zellen. Auffallend ist einerseits, dass bei Bestrahlung mit ^{211}At höhere Schäden quantifiziert wurden (2 Gy 24 h: ^{211}At 47 %; ^{188}Re 18 %). Andererseits waren bei der ^{211}At-Reihe weder 24 h noch 44 h nach Bestrahlung eindeutige dosisabhängige Effekte zu erkennen. Als Ursachen können ein Übergang der Zellpopulation in den spätapoptotischen Zustand (höhere Schädigung, vgl. Abb. 49) sowie andere Effekte (diskutiert in 4.5.1) vermutet werden.

Im Kontrast dazu fand sich für Lymphozyten, die mit ^{188}Re exponiert wurden, nach 24 h eine deutliche Dosiskorrelation, die nach 44 h weniger ausgeprägt war (Abb. 48). Ein Unterschied zwischen den Effekten von ^{211}At und ^{188}Re konnte zudem hinsichtlich des Zeitverlaufs der Apoptoseinduktion festgemacht werden. Die Abbildung 48 verdeutlicht für ^{211}At eine Abnahme der Apoptoserate im Verlauf von 24 h zu 44 h, während für ^{188}Re im gleichen Zeitfenster ein Anstieg der apoptotischen Population gemessen wurde. Die Tatsache, dass ein höherer Anteil der mit ^{211}At geschädigten Zellen nach 44 h bereits spätapoptotische (A^+/PI^+) Merkmale zeigten, weist auf eine andere Kinetik der Schadenentwicklung als bei ^{188}Re hin (Abb. 49). Hinsichtlich der spätapoptotischen Population nach 44 h kann weiter vermerkt werden, dass die Effekte von ^{211}At stärker ausgeprägt waren als die Effekte von ^{188}Re und die ^{188}Re-Reihe im Gegensatz zur Frühapoptose keine Dosiskorrelation mehr zeigte.
Es konnte, sowohl quantitativ eine höhere Schädigung der mononukleären Zellen mit ^{211}At im Vergleich zu ^{188}Re, als auch eine schnellere Kinetik der Apoptoseinduktion festgestellt werden.

Da Messwerte für beide Radionuklide bei übereinstimmenden Dosen vorlagen, wurde der Vergleich des biologischen Wirkung durch Berechnung des Quotienten aus den Apoptoseraten der mit ^{211}At bestrahlten und der mit ^{188}Re bestrahlten Zellen pro Dosispunkt für die 24 h-Reihe ermittelt (vgl. Tab. 22).
Bei 2 Gy wurde für den frühapoptotischen Anteil der Zellen eine um den Faktor 2,6 höhere biologische Wirksamkeit des Alpha-Emitters bestimmt und für den spätapoptotischen/ nekrotischen Anteil eine um den Faktor 1,1 höhere Wirkung. Die Ergebnisse werden ausführlicher in Abschnitt 4.6 diskutiert.
Der hier ermittelte Wert für die Wirksamkeit von Alpha-Strahlung zeigte Übereinstimmung mit den von Friesen et al. [64] publizierten Ergebnissen. Beim Vergleich der Apoptoseinduktion nach Inkubation von Leukämiezellen mit [^{213}Bi]anti-CD45 und [^{90}Y]anti-CD45 konnte eine höhere Apoptoserate bei Exposition mit dem ^{213}Bi-markierten Antikörper gemessen werden. Die Daten belegen eine um den Faktor 2,3 höhere biologische Wirkung für den Alpha-Strahler [64], während die eigenen Versuche bei vergleichbarer Dosis den Faktor 2,6 bestimmten. Obwohl Unterschiede bezüglich der Zellart als auch methodisch hinsichtlich der Apoptosebestimmung bestanden, konnte eine ähnliche Relation der biologischen Wirksamkeit von Alpha-Emitter und Beta-Emitter mit Friesen [64] ermittelt werden. Die geringfügig erhöhte Wirkung von 2,6 im Vergleich zu 2,3 von Friesen könnte mit der höheren Empfindlichkeit der Annexin V/PI-Analyse im Vergleich zur subG1-Methode erklärt werden.
In einer Studie zur relativen biologischen Wirkamkeit (RBW) von ^{213}Bi-Rituximab mit dem Einsatz von Gamma-Strahlung (^{60}Co) als Referenzstrahler von Vandenbulcke et al. [206]

ermittelten die Autoren eine RBW von etwa 2. Es konnte außerdem demonstriert werden, dass die RBW bei Dosissteigerung abnahm [206]. Dieser Effekt konnte mit den eigenen Daten belegt werden (vgl. Tab. 22).

Über konträre Ergebnisse hinsichtlich der biologischen Wirkung in Korrelation zum Zellsystem wurde ebenfalls berichtet. So lag die mit Melanomzellen abgeschätzte RBW bei Neutronen- und Röntgenstrahlung für die Apoptoseinduktion bei 4-5 [159]. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Meijer et al. und Vral et al. [127, 209], die an humanen peripheren Lymphozyten mit dicht ionisierender Strahlung niedrigere RBW in der Größenordnung von 1,3-3,0 fanden. Dieser Einfluss der Zellart wurde durch die Publikationen mehrer Autoren Ryan, Vral, Wistop 2005 [177, 209, 218] bestätigt, die kleine RBW bei hämatopoetischen Zellen fanden, andererseits berichteten Arbeitsgruppen [81, 89] von einer höheren RBW bei nicht hämatopoetischen Zellen.

Eine Übersicht publizierter Daten hinsichtlich der biologischen Wirkung unterschiedlicher Strahlenqualitäten in Bezug auf Apoptoseinduktion gibt die folgende Darstellung (vgl. Tab. 20).

Tab. 20: Literaturübersicht zum Vergleich der Wirkung unterschiedlicher Strahlenqualitäten (BW und RBW) mit dem biologischen Endpunkt Apoptose

Autoren	Strahlenqualität/Dosis	Biologische Wirkung
Friesen et al. [64]	[^{213}Bi]anti-CD45: 0,05 Gy [^{90}Y]anti-CD45: 0,1 Gy	Leukämiezellen: 2,3 (BW)
Vandenbulcke et al. [206]	[^{213}Bi]-Rituximab: 2 Gy ^{60}Co: 2 Gy	B-Zell-Lymphozyten: RBW=2,0
Meijer, Vral et al. [127, 209]	N-Ionen 32-45 MeV/u: 3 Gy ^{137}Cs: 3 Gy	Lymphozyten: RBW=1,3-3,0
Ryan, Vral, Wistop [177, 209, 218]	Neutronen 280 keV ^{137}Cs	Lymphozyten: RBW=1,0
Hendry, Ishida [81, 89]	Neutronen 10 MeV:0,02-1,0 Gy ^{137}Cs: 0,1- 2,0 Gy	Fetale, cerebrale Neuronen Maus: RBW=9,8
Oya et al. [159]	Neutronen 5,8 MeV Röntgen: 240 keV	Tumorzellen RBW=4-5

Die Ergebnisse der zitierten Arbeiten weisen darauf hin, dass die Wirksamkeit unterschiedlicher Strahlenqualitäten von der Dosis, vom biologischen Endpunkt und auch vom biologischen Testsystem abhängen.

4.6 Zusammenfassende Betrachtungen und Einschätzung der biologischen Wirkung der Radionuklide

Vergleich alkalischer und neutraler Komet-Assay

Den beiden Testsystemen kann eine unterschiedliche Spezifität in Bezug auf die Qualität der DNA-Strangbrüche zugesprochen werden. Die dargestellten Relationen der im alkalischen Komet-Assay bestimmten OTM-Werte zu den OTM-Werten des neutralen Komet-Assays ergaben bei der Berechnung unterschiedliche Quotienten (Abb. 18 und Tab. 8). Diese Relationen sind für Doxorubicin und ^{211}At niedrig (1 und 3), während für ^{188}Re ein deutlich höherer Quotient (27,5) ermittelt wurde. Die Kalkulationen deuten zusätzlich darauf hin, dass die DNA-schädigende Wirkung von ^{211}At und Doxorubicin am ehesten den Doppelstrangbrüchen zugeordnet werden kann. Für Doxorubicin wurde ein Quotient von 1 aus der Anzahl der gemessenen ESB+DSB (alkalisch) und der Anzahl der DSB (neutral) ermittelt (vgl. Tab. 9). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin ausschließlich auf einer DSB-Induktion beruhen kann. Da die Spezifität der Komet-Assay-Varianten für Einzel- und Doppelstrangbrüche in Fachkreisen derzeit noch diskutiert wird, sollten die Ergebnisse im Bewusstsein dieses Sachverhalts interpretiert werden [24,132].

Um die Wirkung der Strahlenqualitäten zu vergleichen, wurden die biologischen Effekte bei gleichen Dosen in beiden Komet-Assay-Varianten gegenübergestellt.

Tabelle 21 zeigt die Relationen der biologischen Wirkung für den Vergleich von ^{211}At und ^{188}Re im alkalischen und im neutralen Komet-Assay. Dabei ist anzumerken, dass im alkalischen Testsystem die erwartete Wirkung des Alpha-Strahlers nicht detektiert werden konnte.

Tab. 21: Biologische Wirkung der Radionuklide ^{211}At und ^{188}Re im alkalischen und neutralen Komet-Assay bezogen auf die Messwerte OTM bzw. kalkuliert anhand der Geradengleichung

Alkalischer Komet-Assay				Neutraler Komet-Assay			
Dosis [Gy]	2,5	5,0	10,0	Dosis [Gy]	20	50	100
OTM ^{211}At/OTM ^{188}Re	0,6	0,4	0,3	OTM ^{211}At/OTM ^{188}Re	1,3	1,6	1,9

Mit den Versuchsergebnissen des neutralen Komet-Assays wurden sowohl eine höhere Wirkung von ^{211}At als auch ein Anstieg der BW mit steigender Dosis gefunden.

Die Endpunktbestimmungen mit γ-H2AX-IFM und Annexin V/PI-Durchflusszytometrie ergaben die in der folgenden Tabelle aufgeführten Werte der biologischen Effekte bei übereinstimmenden Energiedosen (vgl. Tab. 22).

Tab. 22: Biologische Wirkung der Radionuklide ^{211}At und ^{188}Re bestimmt mit γ-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie und Annexin V/PI-Durchflusszytometrie

γ-H2AX-Immunfluoreszenz			**Annexin V/PI-Durchflusszytometrie**			
Dosis [Gy]	**0,5 Gy**	**1,0 Gy**	**A^+PI^-**	**2 Gy**	**5 Gy**	**10 Gy**
^{211}At/^{188}Re-10min	**5,8**	**3,7**	**^{211}At/^{188}Re-24h**	**2,6**	**1,3**	**1,3**
^{211}At/^{188}Re-2h	**2,7**	**1,9**	**A^+PI^+**	**2 Gy**	**5 Gy**	**10 Gy**
^{211}At/^{188}Re-24h	**1,7**	**1,1**	**^{211}At/^{188}Re-24h**	**2,1**	**1,3**	**1,5**

Der Vergleich der Effekte der Radionuklide mit der Anzahl der γ-H2AX-Foci nach 10 min, 2 h und 24 h Reparaturzeit bei gleichen Dosen (0,5 Gy und 1 Gy) dokumentierte für jeden Zeitpunkt nach Bestrahlung und jede Dosis eine höhere Wirkung von ^{211}At. Das Verhältnis ^{211}At/^{188}Re verkleinerte sich in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit nach Bestrahlung. Besonders deutlich wurde dies bei 0,5 Gy nach 10 min Reparaturzeit mit Faktor 5,8 und bei 1 Gy mit dem Faktor von 3,7. Es kann ein Zusammenhang mit der Kinetik der Foci-Induktion nach kurzer Zeit bei ^{211}At-Exposition und der hohen Focianzahl bereits bei kleinen Dosen vermutet werden.

Die Wirkungen, die mit der Messung der Apoptoseraten bei gleichen Dosen des Alpha-Emitters ^{211}At und dem Beta-Emitter ^{188}Re bestimmt wurden, zeigt ebenfalls die Tabelle 22. Dabei erfolgte, wie bei den Ergebnisdarstellungen, eine getrennte Betrachtung für die apoptotischen (A^+/PI^-) und die spätapoptotischen/nekrotischen Zellen (A^+/PI^+). Der Vergleich beschränkt sich auf die 24 h-Werte, da nach 1 h nur geringe Effekte beobachtet wurden und die 44 h-Werte durch biologische Limitationen beeinflusst wurden (Sättigung, Kinetik).
Bei der Dosis von 2 Gy wurde für den frühapoptotischen Anteil der Zellen eine um den Faktor 2,6 höhere Wirksamkeit des Alpha-Emitters bestimmt. Bei der Applikation höherer Dosen verringerte sich das Verhältnis auf 1,3.
Insgesamt zeigte die Dosisabhängigkeit der Faktoren (BW) für die jeweilige Population gleiche Tendenzen. Mit Dosiserhöhung sank in beiden Populationen sowohl in der (A^+/PI^-)-Gruppe als auch in der (A^+/PI^+)-Population der Quotient. Es konnte hier ebenfalls gezeigt werden, dass die biologische Wirkung von der Dosis sowie vom biologischen Endpunkt abhingen.

Vergleich der DSB-Reparatur im neutralen Komet-Assay, der γ-H2AX-IFM und der Annexin V/PI-Durchflusszytometrie

Die Detektion der DSB-Reparatur mit γ-H2AX-Immunfluoreszenz nach Exposition der Lymphozyten mit ^{211}At und ^{188}Re nach 24 h Reparaturzeit ermittelte keine Unterschiede im Residualschaden (vgl. Abb. 41). Mit dem neutralen Komet-Assay wurden höhere Residualschäden detektiert als mit γ-H2AX-IFM: ^{211}At: 67 % vs. 22 % und ^{188}Re 70 % vs. 26 % (vgl. Tab. 23). Diese Ergebnisse beruhen auf unterschiedlichen Dosisbereichen, die durch die Sensitivität der Teste bedingt ist, und stellen einen limitierenden Faktor bei der Interpretation der Daten dar.

Tab. 23: Vergleich der DSB-Reparatur nach Bestrahlung der Lymphozyten mit ^{211}At und ^{188}Re für den neutralen Komet-Assay (20 h) und γ-H2AX-IFM (24 h). Dargestellt sind die Residualschäden nach 24 h Reparaturzeit mit den Mittelwerten aus 3-4 Experimenten und der gemittelten Standardabweichung.

Neutraler Komet-Assay			**γ-H2AX-Immunfluoreszenz**		
Astat-211	**Residualschaden [%]**	**s**	**Astat-211**	**Residualschaden [%]**	**s**
15 Gy	**67,0**	**30,5**	**0,5 Gy**	**23,0**	**24,3**
30 Gy	**75,9**	**35,7**	**1,0 Gy**	**22,0**	**19,5**
Rhenium-188			**Rhenium-188**		
20 Gy	**70,8**	**52,4**	**0,5 Gy**	**25,0**	**68,4**
75 Gy	**70,1**	**31,9**	**1,0 Gy**	**26,0**	**43,4**

Eine Diskrepanz zwischen den beiden Methoden besteht in ihrer Spezifität für die Messung der DSB-Reparatur. Die indirekte Messung des DNA-Schadens (Phosphorylierung) bei der γ-H2AX-IFM ist weniger spezifisch als die direkte chemisch-physikalische Detektion beim Komet-Assay [66]. Das Histon H2AX wurde als modulierender Faktor bei der DNA-Reparatur beschrieben ist aber für die Reparaturmechanismen (NHEJ und HR) nicht essentiell [56]. In der Literatur werden derzeit noch unterschiedliche Auffassungen zur Korrelation zwischen der Dephosphorylierung am Histon H2AX und der DSB-Reparatur vertreten [23].

Da der programmierte Zelltod mit der Induktion von DSB korreliert, kommt ein Vergleich mit der Apotoserate nach 24 h in Frage. Der Anteil apoptotischer Zellen betrug für 2 Gy bei ^{211}At 47 % und bei ^{188}Re 18 % (vgl. Abb. 43). Bezieht man die Summe der Annexin V-positiven+PI-positiven Zellen (A+/PI-) + (A+/PI+) in den Vergleich ein, betrug diese bei den Dosen 2 Gy=52 %, 5 Gy=48 % und 10 Gy=65 % für ^{211}At sowie 2 Gy=25 %, 5 Gy= 36 % und 10 Gy= 45 % für ^{188}Re.

Der Vergleich mit den Ergebnissen der Reparatur im neutralen Komet-Assay (vgl. Tab. 23) lässt erkennen, dass die Apoptoseindizes zumindest für ^{211}At mit den Residualschäden des neutralen Komet-Asssay korrelieren, keine Übereinstimmung besteht higegen mit den Ergebnissen zur DSB-Reparatur der γ-H2AX-IFM-Methode. Unterschiede zwischen beiden Radionukliden hinsichtlich unreparierter DSB nach 24 h wurden nur mit der Durchflusszytometrie mit höheren Apoptoseraten nach Schädigung mit ^{211}At nachgewiesen.
Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wilkins et al. [217]. Sie verglichen den neutralen Komet-Assay mit der durchflusszytometrischen Analyse (Annexin V/PI) an Lymphozyten. Der Anteil apoptotischer Zellen im Komet-Assay korrelierte mit der spätapoptotischen Apotoserate der Zellpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse nach 48 h. Der Vergleich nach Bestrahlung zwischen Komet-Assay und durchflusszytometrischer Analyse konnte anhand der eigenen Daten nur mit den 20 h-Werten des neutralen Komet-Assays erfolgen, da keine 44 h-Werte im Komet-Assay analysiert wurden. Die 44 h-Werte der FACS-Analyse zeigten eine weitere Erhöhung der Apoptoseraten vgl. Abb. 48 und die Gesamtheit der Annexin V- und PI- aufnehmenden Zellen (^{211}At: 85 %-87 %; ^{188}Re: 55 %-73 %) eine noch deutlichere Übereinstimung mit den Residualschäden der neutralen Komet-Methode.

4.7 Limitationen

Biologisches Testsystem

Die verwendeten peripheren mononukleären Blutzellen, die zu 75 %-80 % aus Lymphozyten bestehen, sind leicht verfügbar und als strahlensensibles biologisches Testsystem beschrieben. Bei Lymphozyten handelt es sich um eine hochsynchrone Population, da sich alle Zellen in der G_0-Phase des Zellzyklus befinden. Ein wesentlicher Nachteil der Anwendung von Lymphozyten ist die Inhomogenität der untersuchten Zellpopulation, die sich aus mehreren Subpopulationen zusammensetzt. Da T-Zellen und B-Zellen unterschiedlich strahlensensibel sind, wirkt sich das von Spender zu Spender variierende Verhältnis von T- zu B-Zellen limitierend aus. Dieses Problem ließe sich durch eine vorherige Isolierung einer spezifischen Subpopulation umgehen. Zudem besteht eine interindividuelle Variabilität bei der Induktion von Schäden [32], eine Variabilität besteht ebenso im Reparaturverhalten [10]. Um diese Einflüsse auszuschließen, sollten für alle Versuchsreihen Zellen eines Spenders verwendet werden, was trotz umfassender Bemühungen aus organisatorischen Gründen nicht gewährleistet werden konnte. Erstrebenswert wäre ein einheitliches Spendermaterial auch im Hinblick auf die Nuklidvergleiche gewesen. Aus Gründen der begrenzten Verfügbarkeit von ^{211}At und der kurzen physikalischen Halbwertszeit (7 h) war jedoch die Versuchsdurchführung sofort nach Anlieferung des Nuklids für alle drei Methoden notwendig (siehe 2.4.1).

Aufgrund des Versuchsdesigns im alkalischen und neutralen Komet-Assay mit dem Erreichen der Zieldosis über einen Bestrahlungszeitraum von 4 h für beide Radionuklide und den Probeentnahmen nach einheitlichen Zeitpunkten wurden für ^{211}At und ^{188}Re Dosispunkte geringer Abweichung erreicht. Bei Variation der Zeiten für die Entnahme des Aliquots wäre es möglich gewesen, Messpunkte bei exakt übereinstimmenden Dosen zu erzielen. Die linearen Dosis-Wirkungs-Kurven ermöglichten dennoch Vergleiche durch Berechnung des entsprechenden Wertes (OTM) mit der Geradengleichung der Kurvenanpassung.
Der alkalische Komet-Assay ist für die Detektion von DNA-Schäden beim Alpha-Strahler ^{211}At eher ungeeignet, da bei der Darstellung des Tail-Moments in Abhängigkeit von der Dosis die höhere biologische Wirksamkeit nicht bestätigt werden konnte. Bei Dosissteigerung auf 30 Gy entstehen zwar bei einem Teil der Zellen höhere DNA-Schäden aber ein Großteil der Zellen geht in Apoptose (nicht als Ergebnis dargestellt). Diese Effekte wurden ebenfalls bei der Schädigung der Zellen mit Doxorubicin gesehen.
Während durch Bestrahlung mit ^{188}Re kleinere DNA-Bruchstücke (ESB) in höherer Anzahl erzeugt werden, führt die Exposition mit ^{211}At zu wenigen Doppelstrangbrüchen, die vergleichsweise größere Bruchstücke in geringerer Anzahl erzeugen. Die Sensitivität des alkalischen Komet-Assays ist nicht ausreichend, um die vom ^{211}At erzeugten DNA-

Bruchstücke (vorwiegend DSB) zu detektieren.
Der alkalische Komet-Assay kann Aussagen zur Effizienz der Reparatur nach wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen Erholungszeit liefern. Nicht geeignet ist die Methode jedoch um das klonogene Überleben zu erfassen. Das Überleben kann mit dem Koloniebildungsassay untersucht werden, der in einer Zeitspanne von 10 bis 14 Tagen das Überleben nach mehreren Zellzyklen analysiert.
Derzeit werden noch kontroverse Diskussionen zur Spezifität des neutralen Komet-Assays in Bezug auf die DSB-Detektion geführt. Es wird die Wahrscheinlichkeit der Messung von Einzelstrangbrüchen insbesondere im unteren Dosisbereich angeführt [24].
Ein Nachteil des neutralen Komet-Assays ist die geringe Sensitivität in Bezug auf die DSB-Detektion. Daraus ergibt sich, dass der Test nicht in klinisch relevanten Dosisbereichen anwendbar ist.
Bei den Experimenten mit γ-H2AX-Immunfluoreszenz besteht die Möglichkeit der Unterschätzung der Zahl der induzierten Foci nach Bestrahlung mit ^{211}At. Ursache dafür kann sein, dass die optische Auflösung der Einzelfoci durch die lokale Konzentration der Foci mit steigender Dosis nicht mehr möglich war.
Der Vergleich des mit γ-H2AX-IFM detektierten Reparaturverhaltens der Lymphozyten mit der Messung der residualen Schäden im neutralen Komet-Assays führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Aufgrund der unterschiedlichen Assaysensitivitäten konnten jedoch keine übereinstimmenden Dosisbereiche untersucht werden. Die Untersuchungen zur Rekonstitution der DSB im neutralen Komet-Assay konnten erst ab 20 Gy erfolgen, während die γ-H2AX-Foci bis zu Dosen von 5 Gy auswertbar waren. Für einen direkten Vergleich müsste versucht werden, die Sensitivität des neutralen Komet-Assays zu optimieren.

Die Messung der Apoptoseraten nach Bestrahlung mit ^{211}At lassen vermuten, dass der Dosisbereich bis 10 Gy zu hoch angesetzt wurde. Auftretende Sättigungseffekte könnten die widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der Dosiskorrelation mit der biologischen Wirkung erklären. Da eine verzögerte Kinetik der Schadensentwicklung nach Bestrahlung mit ^{188}Re im Vergleich zu ^{211}At beobachtet wurde, ist für weitere Untersuchungen die Ausdehnung der Messungen über ein Zeitfenster bis 72 h nach Bestrahlung in Betracht zu ziehen.

5. Zusammenfassung

Untersucht wurde, ob die unterschiedliche radiobiologische Wirksamkeit von Alpha- und Beta-Strahlung sowie der schädigende Einfluss des Zytostatikums Doxorubicin der Art des Strahlenschadens, Einzelstrangbruch (ESB) oder Doppelstrangbruch (DSB), zugewiesen werden kann. Dazu wurden Dosiseskalationsuntersuchungen an peripheren mononukleären Blutzellen durchgeführt.

Im alkalischen und neutralen Komet-Assay zeigten sich lineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen für ^{211}At und ^{188}Re. Bei gleicher Dosis wurden im alkalischen Test nach ^{211}At-Exposition geringere Schäden als nach ^{188}Re-Exposition gemessen, die vermutlich mit der Größe und Anzahl der DNA-Bruchstücke korrelieren. Die von ^{211}At erzeugten Schäden wurden unterschätzt, da die Sensitivität dieses Tests bezüglich der Qualität der DNA-Schäden im untersuchten Dosisbereich bis 15 Gy zu gering war.

Im neutralen Komet-Assay konnte gezeigt werden, dass der DNA-Schaden mit ^{211}At deutlich ausgeprägter als für ^{188}Re war und von Doppelstrangbrüchen als Schadensqualität ausgegangen werden kann. Daraus ergaben sich Relationen von OTM alkalisch (ESB) zu OTM neutral (DSB) für ^{211}At / ^{188}Re / Doxorubicin entsprechend 3 / 28 / 1, die auf eine höhere Wahrscheinlichkeit für ESB nach Bestrahlung mit ^{188}Re hinwiesen.

Der Vergleich der Reparaturkapazitäten der Lymphozyten nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re im alkalischen Komet-Assay repräsentierte die unterschiedlichen biologischen Wirkungen der beiden Strahlenqualitäten. Die Einzelstrangbrüche nach Applikation von ^{188}Re konnten mit hoher Geschwindigkeit und Effizienz rekonstituiert werden. Im Gegensatz dazu war die Reparatur der Strahlenschäden bis 20 Stunden nach Exposition mit ^{211}At ineffizient. Die Betrachtung der Reparaturkinetiken im neutralen Komet-Assay nach Exposition mit ^{211}At und ^{188}Re weist auf den Zusammenhang von Linearem Energietransfer und der Komplexität der DNA-Schäden hin, da für ^{211}At insgesamt ein höherer Anteil residualer DSB verblieb. Anhand der Reparaturversuche war nachzuweisen, dass 30 Gy ^{211}At die gleiche biologische Wirkung wie 75 Gy ^{188}Re induzieren konnte. Daraus ergibt sich eine um den Faktor 2,5 höhere biologische Wirkung für ^{211}At. In Bezug auf das Schädigungspotential von Doxorubicin wurde eine qualitativ ähnliche Wirkung wie für den Alpha-Strahler analysiert. Die nachgewiesene Inhibierung der DNA-Reparatur verdeutlichte die Induktion von Doppelstrangbrüchen als zytotoxische Wirkung.

Die Detektion von DSB mit der Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte bei allen drei DNA-schädigenden Agenzien mit steigender Dosis bzw. Konzentration eine direkte Korrelation mit der Anzahl der Foci pro Zelle.

Die morphologischen Schädigungsmuster im Zellkern unterschieden sich in Abhängigkeit von der Strahlenqualität. Während der Beta-Strahler einzelne nukleäre Foci produzierte, die

über den gesamten Zellkern verteilt waren, induzierte der Alpha-Strahler Schädigungsspuren. Auffallend waren die Heterogenität der DSB-Induktion unter dem Einfluss von Doxorubicin sowie die verzögerte Phosphorylierung nach Schädigung. Es konnte eine unterschiedliche Kinetik der Schadensinduktion von Doxorubicin einerseits und den Radionukliden andererseits gezeigt werden.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Arbeit beruht auf dem Vergleich der Reparaturkapazitäten für ^{211}At und ^{188}Re mittels Gamma-H2AX-IFM mit einer deutlichen Reduktion der Schäden nach 20 Stunden Reparaturzeit. Dies widerspricht der Vorstellung eines verminderten Reparaturvermögens der multiplen DNA-Schäden nach Hoch-LET-Strahlung. Es wurde ein deutlicher Unterschied zur Reparaturkapazität, die mit dem neutralen Komet-Assay analysiert wurde, festgestellt. Einem direkten Vergleich des residualen DNA-Schadens mittels Gamma-H2AX-IFM und neutralem Komet-Assay steht jedoch entgegen, dass der neutrale Komet-Assay eine viel geringere Empfindlichkeit hat, während die Gamma-H2AX-IFM bei höheren Dosen durch die Vielzahl der Foci den Schaden nicht mehr quantitativ erfassen kann.

Im Gegensatz zum Ausmaß der Residualschäden nach Exposition mit ionisierender Strahlung blieb bei Doxorubicin ein wesentlich höherer Schaden bestehen, der mit dem Ergebnis des neutralen Komet-Assays besser korrelierte und auf anderen Mechanismen beruht.

Die Bestimmung der Apoptoserate in Lymphozyten wurde mit Annexin V-FITC/PI-Durchflusszytometrie realisiert und führte bei beiden Radionukliden zu einem Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen bis 44 Stunden nach Bestrahlung. Dabei wurde ein Unterschied im Zeitverlauf des Auftretens der Apoptosestadien in Abhängigkeit von der Strahlenqualität beobachtet. Die analysierten Apoptoseindizes der ^{211}At-Versuche korrelierten mit den Residualschäden nach 20 Stunden im neutralen Komet-Assay.

Bei Betrachtung der Gesamtheit der experimentell ermittelten Daten kann eine höhere biologische Wirksamkeit von ^{211}At gegenüber ^{188}Re festgestellt werden. In Abhängigkeit vom biologischen Endpunkt und der Dosis konnten Werte von 1,3 bis maximal 5,8 bestimmt werden.

Insofern kann man zusammenfassen, dass der initiale Schaden sowohl für die Radionuklide als auch für Doxorubicin durch den neutralen Komet-Assay und Gamma-H2AX-IFM in der Dosiswirkung ähnlich detektiert wird. In der Untersuchung der Reparaturkapazität ließen sich jedoch deutliche Unterschiede finden.

Während der neutrale Komet-Assay aufgrund der geringen Sensitivität für die Detektion der individuellen Strahlensensibilität von Patienten nicht geeignet ist, kann die Gama-H2AX-IFM durch die sensitive Erfassung von DNA-Schäden im Niedrig-Dosis-Bereich zur individuellen Therapieplanung genutzt werden.

6. Literaturverzeichnis

[1] Ahmed, E.A.; van der Vaart, A.; Barten, A. et al.: Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. DNA Repair (Amst) (2007) 6; 1243-54

[2] Ames, B.N.; Gold, L.S.: Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. Mutat Res (1991) 250; 3-16

[3] Amrein, L.; Loignon, M.; Goulet, A.C. et al.: Chlorambucil cytotoxicity in malignant B lymphocytes is synergistically increased by 2-(morpholin-4-yl)-benzo[h]chomen-4-one (NU7026)-mediated inhibition of DNA double-strand break repair via inhibition of DNA-dependent protein kinase. J Pharmacol Exp Ther (2007) 321; 848-55

[4] Anderson, D.; Yu, T.W.; Browne, M.A.: The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluoresence in situ hybridisation (FISH) assays. Mutat Res (1997) 390; 69-77

[5] Asaithamby, A.; Uematsu, N.; Chatterjee, A.; Story, M.D.; Burma, S.; Chen, D.J.: Repair of HZE-particle-induced DNA double-strand breaks in normal human fibroblasts. Radiat Res (2008) 169; 437-46

[6] Aten, J.A.; Stap, J.; Krawczyk, P.M. et al.: Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. Science (2004) 303; 92-5

[7] Audebert, M.; Salles, B.; Calsou, P.: Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. J Biol Chem (2004) 279; 55117-26

[8] Bacso, Z.; Everson, R.B.; Eliason, J.F.: The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. Cancer Res (2000) 60; 4623-8

[9] Balcer-Kubiczek, E.K.; Attarpour, M.; Edelman, M.J.: The synergistic effect of dimethylamino benzoylphenylurea (NSC #639829) and X-irradiation on human lung carcinoma cell lines. Cancer Chemother Pharmacol (2007) 59; 781-7

[10] Banath, J.P.; Fushiki, M.; Olive, P.L.: Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. Int J Radiat Biol (1998) 73; 649-60

[11] Banath, J.P.; Macphail, S.H.; Olive, P.L.: Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. Cancer Res (2004) 64; 7144-9

[12] Banath, J.P.; Olive, P.L.: Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. Cancer Res (2003) 63; 4347-50

[13] Bauch, T.; Bocker, W.; Mallek, U.; Muller, W.U.; Streffer, C.: Optimization and standardization of the "comet assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells. Strahlenther Onkol (1999) 175; 333-40

[14] Baumgartner, A.; Schmid, T.E.; Cemeli, E.; Anderson, D.: Parallel evaluation of doxorubicin-induced genetic damage in human lymphocytes and sperm using the comet assay and spectral karyotyping. Mutagenesis (2004) 19; 313-8

[15] Behr, T.M.; Behe, M.; Jungclas, H.; Becker, W.; Sgouros, G.: Higher relative biological efficiency of alpha-particles: in vitro veritas, in vitro vanitas? Eur J Nucl Med (2001) 28; 1435-6

[16] Berger, J.M.; Wang, J.C.: Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. Curr Opin Struct Biol (1996) 6; 84-90

[17] Binaschi, M.; Capranico, G.; Dal Bo, L.; Zunino, F.: Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. Mol Pharmacol (1997) 51; 1053-9

[18] Blankenberg, F.G.; Vanderheyden, J.L.; Strauss, H.W.; Tait, J.F.: Radiolabeling of HYNIC-annexin V with technetium-99m for in vivo imaging of apoptosis. Nat Protoc (2006) 1; 108-10

[19] Blasiak, J.; Widera, K.; Pertynski, T.: Hyperthermia can differentially modulate the repair of doxorubicin-damaged DNA in normal and cancer cells. Acta Biochim Pol (2003) 50; 191-5

[20] Bloomer, W.D.; McLaughlin, W.H.; Lambrecht, R.M. et al.: 211At radiocolloid therapy: further observations and comparison with radiocolloids of 32P, 165Dy, and 90Y. Int J Radiat Oncol Biol Phys (1984) 10; 341-8

[21] Bocker, W.; Rolf, W.; Bauch, T.; Muller, W.U.; Streffer, C.: Automated comet assay analysis. Cytometry (1999) 35; 134-44

[22] Bohr, V.A.; Phillips, D.H.; Hanawalt, P.C.: Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. Cancer Res (1987) 47; 6426-36

[23] Bouquet, F.; Muller, C.; Salles, B.: The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. Cell Cycle (2006) 5; 1116-22

[24] Brammer, I.; Zoller, M.; Dikomey, E.: Relationship between cellular radiosensitivity and DNA damage measured by comet assay in human normal, NBS and AT fibroblasts. Int J Radiat Biol (2001) 77; 929-38

[25] Bredow, J.; Kretzschmar, M.; Wunderlich, G. et al.: [Therapy of malignant ascites in vivo by 211At-labelled microspheres]. Nuklearmedizin (2004) 43; 63-8

[26] Cain, K.; Brown, D.G.; Langlais, C.; Cohen, G.M.: Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. J Biol Chem (1999) 274; 22686-92

[27] Cappelli, E.; Rossi, O.; Chessa, L.; Frosina, G.: Efficient DNA base excision repair in ataxia telangiectasia cells. Eur J Biochem (2000) 267; 6883-7

[28] Cariveaua, M.J.; Kalmus, G.W.; Johnke, R.M.; Allison, R.R.; Evans, M.; Holbert, D.: Correlations between radiation-induced double strand breaks and cell cycle checkpoints in X-irradiated NIH/3T3 fibroblasts. Anticancer Res (2006) 26; 3311-6

[29] Cashman, D.J.; Kellogg, G.E.: A computational model for anthracycline binding to

DNA: tuning groove-binding intercalators for specific sequences. J Med Chem (2004) 47; 1360-74

[30] Chaubey, R.C.; Bhilwade, H.N.; Rajagopalan, R.; Bannur, S.V.: Gamma ray induced DNA damage in human and mouse leucocytes measured by SCGE-Pro: a software developed for automated image analysis and data processing for Comet assay. Mutat Res (2001) 490; 187-97

[31] Collingridge, D.R.; Glaser, M.; Osman, S. et al.: In vitro selectivity, in vivo biodistribution and tumour uptake of annexin V radiolabelled with a positron emitting radioisotope. Br J Cancer (2003) 89; 1327-33

[32] Collins, A.; Dusinska, M.; Franklin, M. et al.: Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. Environ Mol Mutagen (1997) 30; 139-46

[33] Collins, A.R.: The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol (2004) 26; 249-61

[34] Collins, A.R.; Dobson, V.L.; Dusinska, M.; Kennedy, G.; Stetina, R.: The comet assay: what can it really tell us? Mutat Res (1997) 375; 183-93

[35] Collins, A.R.; Raslova, K.; Somorovska, M. et al.: DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. Free Radic Biol Med (1998) 25; 373-7

[36] Cook, P.R.; Brazell, I.A.; Jost, E.: Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. J Cell Sci (1976) 22; 303-24

[37] Costantini, D.L.; Chan, C.; Cai, Z.; Vallis, K.A.; Reilly, R.M.: (111)In-labeled trastuzumab (Herceptin) modified with nuclear localization sequences (NLS): an Auger electron-emitting radiotherapeutic agent for HER2/neu-amplified breast cancer. J Nucl Med (2007) 48; 1357-68

[38] Costes, S.V.; Boissiere, A.; Ravani, S.; Romano, R.; Parvin, B.; Barcellos-Hoff, M.H.: Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. Radiat Res (2006) 165; 505-15

[39] Coupland, S.E.; Hummel, M.; Stein, H.: [Lymphatic system and differentiation of B and T lymphocytes]. Pathologe (2000) 21; 106-12

[40] Couturier, O.; Faivre-Chauvet, A.; Filippovich, I.V. et al.: Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. Clin Cancer Res (1999) 5; 3165s-3170s

[41] Cramers, P.; Atanasova, P.; Vrolijk, H. et al.: Pre-exposure to low doses: modulation of X-ray-induced dna damage and repair? Radiat Res (2005) 164; 383-90

[42] Cummings, J.; Bartoszek, A.; Smyth, J.F.: Determination of covalent binding to intact DNA, RNA, and oligonucleotides by intercalating anticancer drugs using high-performance liquid chromatography. Studies with doxorubicin and NADPH cytochrome P-450 reductase. Anal Biochem (1991) 194; 146-55

[43] Dahm-Daphi, J.; Dikomey, E.; Pyttlik, C.: Relationship between non-reparable DNA strand breaks and cell survival studied in X-irradiated CHO, CHO K1, xrs1 and xrs5 cells. Int J Radiat Biol (1994) 65; 657-63

[44] de Oliveira, E.M.; Suzuki, M.F.; do Nascimento, P.A.; da Silva, M.A.; Okazaki, K.:

Evaluation of the effect of 90Sr beta-radiation on human blood cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. Mutat Res (2001) 476; 109-21

[45] Desai, N.; Davis, E.; O'Neill, P.; Durante, M.; Cucinotta, F.A.; Wu, H.: Immunofluorescence detection of clustered gamma-H2AX foci induced by HZE-particle radiation. Radiat Res (2005) 164; 518-22

[46] Dikomey, E.; Dahm-Daphi, J.; Brammer, I.; Martensen, R.; Kaina, B.: Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. Int J Radiat Biol (1998) 73; 269-78

[47] Dikomey, E.; Lorenzen, J.: Saturated and unsaturated repair of DNA strand breaks in CHO cells after X-irradiation with doses ranging from 3 to 90 Gy. Int J Radiat Biol (1993) 64; 659-67

[48] Djuzenova, C.S.; Schindler, D.; Stopper, H.; Hoehn, H.; Flentje, M.; Oppitz, U.: Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population, using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. Lab Invest (1999) 79; 699-705

[49] Doberenz, I.D., W.; Wunderlich, G.;Franke, W.-G.; Heidelbach, J:G.;Fischer, S.;Dreyer, R.;Kessler, L.: Endoarterielle Therapie eines Zungenkazinoms mit At-211-markierten Humanserumalbumin-Mikrosphären - erste klinische Erfahrungen. European-American Communications in Nuclear Medicine (1990) 21; 124-127

[50] Doehner, K.: Klassische und molekulare Zytogenetik in der Hämatologie und Onkologie. Onkologe (2001) 7; 1028-1038

[51] Dunkern, T.R.; Wedemeyer, I.; Baumgartner, M.; Fritz, G.; Kaina, B.: Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. DNA Repair (Amst) (2003) 2; 49-60

[52] El-Awady, R.A.; Dikomey, E.; Dahm-Daphi, J.: Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. Br J Cancer (2003) 89; 593-601

[53] Fairbairn, D.W.; Olive, P.L.; O'Neill, K.L.: The comet assay: a comprehensive review. Mutat Res (1995) 339; 37-59

[54] Farkasova, T.; Gurska, S.; Witkovsky, V.; Gabelova, A.: Significance of amino acid substitution variants of DNA repair genes in radiosusceptibility of cervical cancer patients; a pilot study. Neoplasma (2008) 55; 330-7

[55] Fenech, M.: The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. Environ Health Perspect (1993) 101 Suppl 3; 101-7

[56] Fernandez-Capetillo, O.; Allis, C.D.; Nussenzweig, A.: Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. J Exp Med (2004) 199; 1671-7

[57] Fernandez-Capetillo, O.; Chen, H.T.; Celeste, A. et al.: DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. Nat Cell Biol (2002) 4; 993-7

[58] Finnon, P.; Robertson, N.; Dziwura, S. et al.: Evidence for significant heritability of apoptotic and cell cycle responses to ionising radiation. Hum Genet (2008) 123; 485-93

[59] Fishel, M.L.; He, Y.; Smith, M.L.; Kelley, M.R.: Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. Clin Cancer Res (2007) 13; 260-7

[60] Foster, H.A.; Bridger, J.M.: The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture. Chromosoma (2005) 114; 212-29

[61] Frankenberg-Schwager, M.: Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. Radiother Oncol (1989) 14; 307-20

[62] Friedberg, E.C.: DNA repair and mutagenesis. 2.ed. ed. Washinton: ASM Press, 2006

[63] Friedberg, E.C.; McDaniel, L.D.; Schultz, R.A.: The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. Curr Opin Genet Dev (2004) 14; 5-10

[64] Friesen, C.; Glatting, G.; Koop, B. et al.: Breaking chemoresistance and radioresistance with [213Bi]anti-CD45 antibodies in leukemia cells. Cancer Res (2007) 67; 1950-8

[65] Friesen, C.; Uhl, M.; Pannicke, U.; Schwarz, K.; Miltner, E.; Debatin, K.M.: DNA-Ligase IV and DNA-PK Play a Critical Role in Deficient Caspases Activation in Apoptosis-resistant Cancer Cells Using Doxorubicin. Mol Biol Cell (2008)

[66] Gallmeier, E.; Winter, J.M.; Cunningham, S.C.; Kahn, S.R.; Kern, S.E.: Novel genotoxicity assays identify norethindrone to activate p53 and phosphorylate H2AX. Carcinogenesis (2005) 26; 1811-20

[67] Godard, T.; Deslandes, E.; Lebailly, P. et al.: Comet assay and DNA flow cytometry analysis of staurosporine-induced apoptosis. Cytometry (1999) 36; 117-22

[68] Godard, T.; Deslandes, E.; Lebailly, P. et al.: Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays. Histochem Cell Biol (1999) 112; 155-61

[69] Goldberg, J.E.; Sherwood, S.W.; Clayberger, C.: A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. J Immunol Methods (1999) 224; 1-9

[70] Gomolka, M.; Rossler, U.; Hornhardt, S.; Walsh, L.; Panzer, W.; Schmid, E.: Measurement of the initial levels of DNA damage in human lymphocytes induced by 29 kV X rays (mammography X rays) relative to 220 kV X rays and gamma rays. Radiat Res (2005) 163; 510-9

[71] Green, M.H.; Lowe, J.E.; Harcourt, S.A. et al.: UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique. Mutat Res (1992) 273; 137-44

[72] Gutierrez, S.; Carbonell, E.; Galofre, P.; Creus, A.; Marcos, R.: The alkaline single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay applied to the analysis of radiation-induced DNA damage in thyroid cancer patients treated with 131I. Mutat Res (1998) 413; 111-9

[73] Hall, E.J.: Radiobiology for the Radiologist. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wikins, 2006

[74] Hamada, N.; Schettino, G.; Kashino, G. et al.: Histone H2AX phosphorylation in normal human cells irradiated with focused ultrasoft X rays: evidence for chromatin movement during repair. Radiat Res (2006) 166; 31-8

[75] Hamasaki, K.; Imai, K.; Nakachi, K.; Takahashi, N.; Kodama, Y.; Kusunoki, Y.: Short-term culture and gammaH2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. Environ Mol Mutagen (2007) 48; 38-47

[76] Hanelt, S.; Helbig, R.; Hartmann, A.; Lang, M.; Seidel, A.; Speit, G.: A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. Mutat Res (1997) 390; 179-88

[77] Hansen, L.T.; Lundin, C.; Spang-Thomsen, M.; Petersen, L.N.; Helleday, T.: The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. Int J Cancer (2003) 105; 472-9

[78] Hartmann, A.; Agurell, E.; Beevers, C. et al.: Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. Mutagenesis (2003) 18; 45-51

[79] Hasper, H.J.; Weghorst, R.M.; Richel, D.J.; Meerwaldt, J.H.; Olthuis, F.M.; Schenkeveld, C.E.: A new four-color flow cytometric assay to detect apoptosis in lymphocyte subsets of cultured peripheral blood cells. Cytometry (2000) 40; 167-71

[80] Hazlehurst, L.A.; Valkov, N.; Wisner, L. et al.: Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells. Blood (2001) 98; 1897-903

[81] Hendry, J.H.: Repair of cellular damage after high LET irradiation. J Radiat Res (Tokyo) (1999) 40 Suppl; 60-5

[82] Henery, S.; George, T.; Hall, B.; Basiji, D.; Ortyn, W.; Morrissey, P.: Quantitative image based apoptotic index measurement using multispectral imaging flow cytometry: a comparison with standard photometric methods. Apoptosis (2008) 13; 1054-63

[83] Hengartner, M.O.: The biochemistry of apoptosis. Nature (2000) 407; 770-6

[84] Hengstler, J.G.; Bockisch, A.; Fuchs, J. et al.: Induction of DNA single-strand breaks by 131I and 99mTc in human mononuclear blood cells in vitro and extrapolation to the in vivo situation. Radiat Res (2000) 153; 512-20

[85] Hertveldt, K.; Philippe, J.; Thierens, H.; Cornelissen, M.; Vral, A.; De Ridder, L.: Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. Int J Radiat Biol (1997) 71; 429-33

[86] Hoeijmakers, J.H.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature (2001) 411; 366-74

[87] Iliakis, G.; Wang, H.; Perrault, A.R. et al.: Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. Cytogenet Genome Res (2004) 104; 14-20

[88] Imam, S.K.: Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review. Int J Radiat Oncol Biol Phys (2001) 51; 271-8

[89] Ishida, Y.; Ohmachi, Y.; Nakata, Y. et al.: Dose-response and large relative biological effectiveness of fast neutrons with regard to mouse fetal cerebral neuron apoptosis. J Radiat Res (Tokyo) (2006) 47; 41-7

[90] Iwabuchi, K.; Hashimoto, M.; Matsui, T.; Kurosawa, A.; Adachi, N.; Date, T.: Cell sorting analysis of cell cycle-dependent X-ray sensitivity in end joining-deficient human cells. Biochem Biophys Res Commun (2008) 372; 662-7

[91] Jardine, L.: Decays of 211At, 211Po and 207 Bi. Phys.Rev. (1975); 1385-1391

[92] Jeggo, P.A.; Carr, A.M.; Lehmann, A.R.: Splitting the ATM: distinct repair and checkpoint defects in ataxia-telangiectasia. Trends Genet (1998) 14; 312-6

[93] Karlsson, K.H.; Stenerlow, B.: Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions. Radiat Res (2004) 161; 517-27

[94] Karukstis, K.K.; Thompson, E.H.; Whiles, J.A.; Rosenfeld, R.J.: Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. Biophys Chem (1998) 73; 249-63

[95] Keen, H.G.; Dekker, B.A.; Disley, L. et al.: Imaging apoptosis in vivo using 124I-annexin V and PET. Nucl Med Biol (2005) 32; 395-402

[96] Kellogg, G.E.; Scarsdale, J.N.; Fornari, F.A., Jr.: Identification and hydropathic characterization of structural features affecting sequence specificity for doxorubicin intercalation into DNA double-stranded polynucleotides. Nucleic Acids Res (1998) 26; 4721-32

[97] Kern, P.; Keilholz, L.; Forster, C.; Seegenschmiedt, M.H.; Sauer, R.; Herrmann, M.: In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. Int J Radiat Biol (1999) 75; 995-1003

[98] Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer (1972) 26; 239-57

[99] Kizilian-Martel, N.; Wilkins, R.C.; McLean, J.R.; Malone, S.; Raaphorst, G.P.: Prediction of radiosensitivity by measurement of X-ray induced apoptosis in human blood using the comet assay. Anticancer Res (2003) 23; 3847-54

[100] Kleinsasser, N.H.; Wagner, C.; Wallner, B.C.; Harreus, U.A.; Kastenbauer, E.R.: Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients. Mutat Res (2001) 491; 151-61

[101] Kosz-Vnenchak, M.; Rokosz, K.: The "comet" assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. Folia Biol (Krakow) (1997) 45; 153-6

[102] Kumaravel, T.S.; Jha, A.N.: Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. Mutat Res (2006) 605; 7-16

[103] Kunkel, T.A.; Bebenek, K.: DNA replication fidelity. Annu Rev Biochem (2000) 69; 497-529

[104] Kuo, L.J.; Yang, L.X.: Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo (2008) 22; 305-9

[105] Kurz, E.U.; Douglas, P.; Lees-Miller, S.P.: Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. J Biol Chem (2004) 279; 53272-81

[106] Lankoff, A.; Bialczyk, J.; Dziga, D. et al.: The repair of gamma-radiation-induced DNA damage is inhibited by microcystin-LR, the PP1 and PP2A phosphatase inhibitor. Mutagenesis (2006) 21; 83-90

[107] Larsen, R.H.; Hoff, P.; Vergote, I.B. et al.: Alpha-particle radiotherapy with 211At-labeled monodisperse polymer particles, 211At-labeled IgG proteins, and free 211At in a murine intraperitoneal tumor model. Gynecol Oncol (1995) 57; 9-15

[108] Leadon, S.A.: Repair of DNA Damage Produced by Ionizing Radiation: A Minireview. Semin Radiat Oncol (1996) 6; 295-305

[109] Leatherbarrow, E.L.; Harper, J.V.; Cucinotta, F.A.; O'Neill, P.: Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation. Int J Radiat Biol (2006) 82; 111-8

[110] L'Ecuyer, T.; Sanjeev, S.; Thomas, R. et al.: DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. Am J Physiol Heart Circ Physiol (2006) 291; H1273-80

[111] Leprat, F.; Alapetite, C.; Rosselli, F. et al.: Impaired DNA repair as assessed by the "comet" assay in patients with thyroid tumors after a history of radiation therapy: a preliminary study. Int J Radiat Oncol Biol Phys (1998) 40; 1019-26

[112] Li, Y.; Cozzi, P.J.; Qu, C.F. et al.: Cytotoxicity of human prostate cancer cell lines in vitro and induction of apoptosis using 213Bi-Herceptin alpha-conjugate. Cancer Lett (2004) 205; 161-71

[113] Li, Z.X.; Wang, T.T.; Wu, Y.T. et al.: Adriamycin induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. Asian J Androl (2008) 10; 749-57

[114] Liu, L.F.: DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. Annu Rev Biochem (1989) 58; 351-75

[115] Lobrich, M.; Rief, N.; Kuhne, M. et al.: In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. Proc Natl Acad Sci U S A (2005) 102; 8984-9

[116] Lucas, J.N.; Tenjin, T.; Straume, T. et al.: Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence in situ hybridization. Int J Radiat Biol (1989) 56; 35-44

[117] Lyu, Y.L.; Kerrigan, J.E.; Lin, C.P. et al.: Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. Cancer Res (2007) 67; 8839-46

[118] MacPhail, S.H.; Banath, J.P.; Yu, T.Y.; Chu, E.H.; Lambur, H.; Olive, P.L.: Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. Int J Radiat Biol (2003) 79; 351-8

[119] MacPhail, S.H.; Banath, J.P.; Yu, Y.; Chu, E.; Olive, P.L.: Cell cycle-dependent

expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. Radiat Res (2003) 159; 759-67

[120] Malyguine, A.; Derby, E.; Brooks, A.; Reddy, V.; Baseler, M.; Sayers, T.: Study of diverse mechanisms of cell-mediated cytotoxicity in gene-targeted mice using flow cytometric cytotoxicity assay. Immunol Lett (2002) 83; 55-9

[121] Markova, E.; Schultz, N.; Belyaev, I.Y.: Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. Int J Radiat Biol (2007) 83; 319-29

[122] Matteucci, C.; Grelli, S.; De Smaele, E.; Fontana, C.; Mastino, A.: Identification of nuclei from apoptotic, necrotic, and viable lymphoid cells by using multiparameter flow cytometry. Cytometry (1999) 35; 145-53

[123] Mazur, L.: Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts. Mutat Res (2000) 468; 27-33

[124] McKelvey-Martin, V.J.; Green, M.H.; Schmezer, P.; Pool-Zobel, B.L.; De Meo, M.P.; Collins, A.: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. Mutat Res (1993) 288; 47-63

[125] McKelvey-Martin, V.J.; Melia, N.; Walsh, I.K. et al.: Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. Mutat Res (1997) 375; 93-104

[126] Meador, J.A.; Zhao, M.; Su, Y.; Narayan, G.; Geard, C.R.; Balajee, A.S.: Histone H2AX is a critical factor for cellular protection against DNA alkylating agents. Oncogene (2008)

[127] Meijer, A.E.; Kronqvist, U.S.; Lewensohn, R.; Harms-Ringdahl, M.: RBE for the induction of apoptosis in human peripheral lymphocytes exposed in vitro to high-LET radiation generated by accelerated nitrogen ions. Int J Radiat Biol (1998) 73; 169-77

[128] Mersch-Sundermann, V.; Kassie, F.; Faust, F.: Humanes Biomonitoring DNA-schädigender Effekte in primären Lymphozyten mit der Einzelzellgelelektrophorese (Kometassay): eine Übersicht des aktuellen Erkenntnisstandes. Umweltmed Forsc Prax (2004) 9; 138-149

[129] Morgan, M.A.; Meirovitz, A.; Davis, M.A.; Kollar, L.E.; Hassan, M.C.; Lawrence, T.S.: Radiotherapy combined with gemcitabine and oxaliplatin in pancreatic cancer cells. Transl Oncol (2008) 1; 36-43

[130] Muller, W.U.; Bauch, T.; Streffer, C.; Niedereichholz, F.; Bocker, W.: Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines. Int J Radiat Biol (1994) 65; 315-9

[131] Muller, W.U.; Bauch, T.; Streffer, C.; von Mallek, D.: Does radiotherapy affect the outcome of the comet assay? Br J Radiol (2002) 75; 608-14

[132] Muller, W.U.; Ciborovius, J.; Bauch, T. et al.: Analysis of the Action of the Restriction Endonuclease AluI Using Three Different Comet Assay Protocols. Strahlenther Onkol (2004) 180; 655-664

[133] Munshi, A.; Hobbs, M.; Meyn, R.E.: Clonogenic cell survival assay. Methods Mol Med

(2005) 110; 21-8

[134] Murakami, Y.; Takamatsu, H.; Taki, J. et al.: 18F-labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging (2004) 31; 469-74

[135] Mustonen, R.; Bouvier, G.; Wolber, G.; Stohr, M.; Peschke, P.; Bartsch, H.: A comparison of gamma and neutron irradiation on Raji cells: effects on DNA damage, repair, cell cycle distribution and lethality. Mutat Res (1999) 429; 169-79

[136] Myllyperkio, M.H.; Koski, T.R.; Vilpo, L.M.; Vilpo, J.A.: Gamma-irradiation-induced DNA single- and double-strand breaks and their repair in chronic lymphocytic leukemia cells of variable radiosensitivity. Hematol Cell Ther (1999) 41; 95-103

[137] Nicotera, P.; Melino, G.: Regulation of the apoptosis-necrosis switch. Oncogene (2004) 23; 2757-65

[138] Noel, G.; Giocanti, N.; Fernet, M.; Megnin-Chanet, F.; Favaudon, V.: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery. BMC Cell Biol (2003) 4; 7

[139] Olive, P.L.: The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. Radiat Res (1998) 150; S42-51

[140] Olive, P.L.: DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. Int J Radiat Biol (1999) 75; 395-405

[141] Olive, P.L.: The comet assay. An overview of techniques. Methods Mol Biol (2002) 203; 179-94

[142] Olive, P.L.: Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. Methods Cell Biol (2004) 75; 355-73

[143] Olive, P.L.; Banath, J.P.: Growth fraction measured using the comet assay. Cell Prolif (1992) 25; 447-57

[144] Olive, P.L.; Banath, J.P.: Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. Int J Radiat Biol (1993) 64; 349-58

[145] Olive, P.L.; Banath, J.P.: Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. Mutat Res (1993) 294; 275-83

[146] Olive, P.L.; Banath, J.P.: Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. Radiat Res (1995) 142; 144-52

[147] Olive, P.L.; Banath, J.P.: Multicell spheroid response to drugs predicted with the comet assay. Cancer Res (1997) 57; 5528-33

[148] Olive, P.L.; Banath, J.P.: Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. Int J Radiat Oncol Biol Phys (2004) 58; 331-5

[149] Olive, P.L.; Banath, J.P.: The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nat Protoc (2006) 1; 23-9

[150] Olive, P.L.; Banath, J.P.; Durand, R.E.: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. Radiat Res (1990) 122; 86-94

[151] Olive, P.L.; Banath, J.P.; Durand, R.E.: Detection of subpopulations resistant to DNA-damaging agents in spheroids and murine tumours. Mutat Res (1997) 375; 157-65

[152] Olive, P.L.; Banath, J.P.; Keyes, M.: Residual gammaH2AX after irradiation of human lymphocytes and monocytes in vitro and its relation to late effects after prostate brachytherapy. Radiother Oncol (2008) 86; 336-46

[153] Olive, P.L.; Banath, J.P.; Sinnott, L.T.: Phosphorylated histone H2AX in spheroids, tumors, and tissues of mice exposed to etoposide and 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,3-dioxide. Cancer Res (2004) 64; 5363-9

[154] Olive, P.L.; Durand, R.E.: Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. Cytometry A (2005) 66; 1-8

[155] Olive, P.L.; Frazer, G.; Banath, J.P.: Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. Radiat Res (1993) 136; 130-6

[156] Olive, P.L.; Vikse, C.M.; Banath, J.P.: Use of the comet assay to identify cells sensitive to tirapazamine in multicell spheroids and tumors in mice. Cancer Res (1996) 56; 4460-3

[157] Olive, P.L.; Wlodek, D.; Banath, J.P.: DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. Cancer Res (1991) 51; 4671-6

[158] Owen, D.G.; McNamee, J.P.; Raaphorst, G.P.; Ng, C.E.: Potentiation of cell killing by low-dose-rate radiation by camptothecin is related to an increase in the level of DNA double-strand breaks. Radiat Res (2002) 157; 149-57

[159] Oya, N.; Zolzer, F.; Werner, F.; Streffer, C.: Similar extent of apoptosis induction at doses of X-rays and neutrons isoeffective for cell inactivation. Strahlenther Onkol (2008) 184; 270-5

[160] Panyutin, I.V.; Sedelnikova, O.A.; Bonner, W.M.; Panyutin, I.G.; Neumann, R.D.: DNA damage produced by 125I-triplex-forming oligonucleotides as a measure of their successful delivery into cell nuclei. Ann N Y Acad Sci (2005) 1058; 140-50

[161] Pascucci, B.; Russo, M.T.; Crescenzi, M.; Bignami, M.; Dogliotti, E.: The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. Nucleic Acids Res (2005) 33; 280- 8

[162] Peng, L.; Jiang, H.; Bradely, C.: Detection of B lymphoma cells undergoing apoptosis by Annexin-V assay. Chin Med Sci J (2002) 17; 17-21

[163] Peterson-Roth, E.; Reynolds, M.; Quievryn, G.; Zhitkovich, A.: Mismatch repair proteins are activators of toxic responses to chromium-DNA damage. Mol Cell Biol (2005) 25; 3596-607

[164] Pilch, D.R.; Sedelnikova, O.A.; Redon, C.; Celeste, A.; Nussenzweig, A.; Bonner, W.M.: Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. Biochem Cell Biol (2003) 81; 123-9

[165] Pinto, M.; Prise, K.M.; Michael, B.D.: Double strand break rejoining after irradiation of human fibroblasts with X rays or alpha particles: PFGE studies and numerical models. Radiat Prot Dosimetry (2002) 99; 133-6

[166] Poller, F.; Bauch, T.; Sauerwein, W.; Bocker, W.; Wittig, A.; Streffer, C.: Comet assay study of DNA damage and repair of tumour cells following boron neutron capture irradiation with fast d(14) + Be neutrons. Int J Radiat Biol (1996) 70; 593-602

[167] Powell, S.; McMillan, T.J.: DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. Radiother Oncol (1990) 19; 95-108

[168] Price, M.E.; McKelvey-Martin, V.J.; Robson, T.; Hirst, D.G.; McKeown, S.R.: Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in bladder tumor cells. Radiat Res (2000) 153; 788-94

[169] Prise, K.M.; Schettino, G.; Folkard, M.; Held, K.D.: New insights on cell death from radiation exposure. Lancet Oncol (2005) 6; 520-8

[170] Rebbaa, A.; Zheng, X.; Chu, F.; Mirkin, B.L.: The role of histone acetylation versus DNA damage in drug-induced senescence and apoptosis. Cell Death Differ (2006) 13; 1960-7

[171] Robinson, B.W.; Ostruszka, L.; Im, M.M.; Shewach, D.S.: Promising combination therapies with gemcitabine. Semin Oncol (2004) 31; 2-12

[172] Rogakou, E.P.; Boon, C.; Redon, C.; Bonner, W.M.: Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. J Cell Biol (1999) 146; 905-16

[173] Rogakou, E.P.; Nieves-Neira, W.; Boon, C.; Pommier, Y.; Bonner, W.M.: Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. J Biol Chem (2000) 275; 9390-5

[174] Rossler, U.; Hornhardt, S.; Seidl, C. et al.: The sensitivity of the alkaline comet assay in detecting DNA lesions induced by X rays, gamma rays and alpha particles. Radiat Prot Dosimetry (2006) 122; 154-9

[175] Rothkamm, K.; Kruger, I.; Thompson, L.H.; Lobrich, M.: Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. Mol Cell Biol (2003) 23; 5706-15

[176] Rothkamm, K.; Lobrich, M.: Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. Proc Natl Acad Sci U S A (2003) 100; 5057-62

[177] Ryan, L.A.; Wilkins, R.C.; McFarlane, N.M.; Sung, M.M.; McNamee, J.P.; Boreham, D.R.: Relative biological effectiveness of 280 keV neutrons for apoptosis in human lymphocytes. Health Phys (2006) 91; 68-75

[178] Rydberg, B.: Radiation-induced DNA damage and chromatin structure. Acta Oncol (2001) 40; 682-5

[179] Rydberg, B.; Lobrich, M.; Cooper, P.K.: Repair of clustered DNA damage caused by high LET radiation in human fibroblasts. Phys Med (1998) 14 Suppl 1; 24-8

[180] Salama, S.A.; Serrana, M.; Au, W.W.: Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. Mutat Res (1999) 436; 99-112

[181] Sasaki, Y.F.; Izumiyama, F.; Nishidate, E.; Matsusaka, N.; Tsuda, S.: Detection of rodent liver carcinogen genotoxicity by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). Mutat Res (1997) 391; 201-14

[182] Sasaki, Y.F.; Saga, A.; Akasaka, M. et al.: In vivo genotoxicity of ortho-phenylphenol, biphenyl, and thiabendazole detected in multiple mouse organs by the alkaline single cell gel electrophoresis assay. Mutat Res (1997) 395; 189-98

[183] Scherthan, H.; Hieber, L.; Braselmann, H.; Meineke, V.; Zitzelsberger, H.: Accumulation of DSBs in gamma-H2AX domains fuel chromosomal aberrations. Biochem Biophys Res Commun (2008) 371; 694-7

[184] Schmitz, A.; Bayer, J.; Dechamps, N.; Thomas, G.: Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. Int J Radiat Oncol Biol Phys (2003) 57; 769-78

[185] Schultz, L.B.; Chehab, N.H.; Malikzay, A.; Halazonetis, T.D.: p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. J Cell Biol (2000) 151; 1381-90

[186] Sedelnikova, O.A.; Panyutin, I.V.; Neumann, R.D.; Bonner, W.M.; Panyutin, I.G.: Assessment of DNA damage produced by 125I-triplex-forming oligonucleotides in cells. Int J Radiat Biol (2004) 80; 927-31

[187] Sedelnikova, O.A.; Rogakou, E.P.; Panyutin, I.G.; Bonner, W.M.: Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. Radiat Res (2002) 158; 486-92

[188] Sgouros, G.; Ballangrud, A.M.; Jurcic, J.G. et al.: Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: 213Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia. J Nucl Med (1999) 40; 1935-46

[189] Shen, H.; Schultz, M.; Kruh, G.D.; Tew, K.D.: Increased expression of DNA-dependent protein kinase confers resistance to adriamycin. Biochim Biophys Acta (1998) 1381; 131-8

[190] Shiloh, Y.: ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nat Rev Cancer (2003) 3; 155-68

[191] Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res (1988) 175; 184-91

[192] Singh, N.P.; Stephens, R.E.; Schneider, E.L.: Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. Int J Radiat Biol (1994) 66; 23-8

[193] Speit, G.; Hartmann, A.: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. Methods Mol Biol (2005) 291; 85-95

[194] Stabin, M.G.; Siegel, J.A.: Physical models and dose factors for use in internal dose assessment. Health Phys (2003) 85; 294-310

[195] Stinchcomb, T.G.; Roeske, J.C.: Values of "S," <z1>, and <(z1)2> for dosimetry using alpha-particle emitters. Med Phys (1999) 26; 1960-71

[196] Supiot, S.; Gouard, S.; Charrier, J. et al.: Mechanisms of cell sensitization to alpha radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. Clin Cancer Res (2005) 11; 7047s-7052s

[197] Taneja, N.; Davis, M.; Choy, J.S. et al.: Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. J Biol Chem (2004) 279; 2273-80

[198] Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D. et al.: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen (2000) 35; 206-21

[199] Trenz, K.; Schutz, P.; Speit, G.: Radiosensitivity of lymphoblastoid cell lines with a heterozygous BRCA1 mutation is not detected by the comet assay and pulsed field gel electrophoresis. Mutagenesis (2005) 20; 131-7

[200] Trivedi, R.N.; Almeida, K.H.; Fornsaglio, J.L.; Schamus, S.; Sobol, R.W.: The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. Cancer Res (2005) 65; 6394-400

[201] Ukai, A.; Maruyama, T.; Mochizuki, S. et al.: Role of DNA polymerase theta in tolerance of endogenous and exogenous DNA damage in mouse B cells. Genes Cells (2006) 11; 111-21

[202] Ulmer, A.J.; Scholz, W.; Ernst, M.; Brandt, E.; Flad, H.D.: Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on Percoll. Immunobiology (1984) 166; 238-50

[203] van der Schans, G.P.; Timmerman, A.J.; Bruijnzeel, P.L.: Detection of single-strand breaks and base damage in DNA of human white blood cells as a tool for biological dosimetry of exposure to ionizing radiation. Mil Med (2002) 167; 5-7

[204] van Engeland, M.; Nieland, L.J.; Ramaekers, F.C.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C.P.: Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry (1998) 31; 1-9

[205] Van Goethem, F.; Lison, D.; Kirsch-Volders, M.: Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. Mutat Res (1997) 392; 31-43

[206] Vandenbulcke, K.; De Vos, F.; Offner, F. et al.: In vitro evaluation of 213Bi-rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and chromosomal damage. Eur J Nucl Med Mol Imaging (2003) 30; 1357-64

[207] Vandenbulcke, K.; Thierens, H.; De Vos, F. et al.: In vitro screening for synergism of high-linear energy transfer 213Bi-radiotherapy with other therapeutic agents for the treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cancer Biother Radiopharm (2006) 21; 364-72

[208] Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods (1995) 184; 39-51

[209] Vral, A.; Cornelissen, M.; Thierens, H. et al.: Apoptosis induced by fast neutrons versus 60Co gamma-rays in human peripheral blood lymphocytes. Int J Radiat Biol

(1998) 73; 289-95

[210] Wang, J.C.; Qian, B.L.: Detection of DNA damage in peripheral lymphocytes by 7 compounds using comet assay. Zhongguo Yao Li Xue Bao (1997) 18; 451-4

[211] Ward, J.F.: DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol (1988) 35; 95-125

[212] Wardman, P.; Dennis, M.F.; Stratford, M.R.; White, J.: Extracellular: intracellular and subcellular concentration gradients of thiols. Int J Radiat Oncol Biol Phys (1992) 22; 751-4

[213] Watanabe, N.; Kanegane, H.; Kinuya, S. et al.: The radiotoxicity of 131I therapy of thyroid cancer: assessment by micronucleus assay of B lymphocytes. J Nucl Med (2004) 45; 608-11

[214] Wei, L.; Luo, R.C.; Zhang, J.Y.; Yan, X.; Fang, Y.X.; Fei, L.H.: [Biological response of B-cell lymphoma cells in vitro to 131I-rituximab]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao (2006) 26; 211-3

[215] West, C.M.; Davidson, S.E.; Elyan, S.A. et al.: Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. Int J Radiat Oncol Biol Phys (2001) 51; 10-5

[216] Whitaker, S.J.; Powell, S.N.; McMillan, T.J.: Molecular assays of radiation-induced DNA damage. Eur J Cancer (1991) 27; 922-8

[217] Wilkins, R.C.; Kutzner, B.C.; Truong, M.; Sanchez-Dardon, J.; McLean, J.R.: Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. Cytometry (2002) 48; 14-9

[218] Wistop, A.; Keller, U.; Sprung, C.N.; Grabenbauer, G.G.; Sauer, R.; Distel, L.V.: Individual radiosensitivity does not correlate with radiation-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines or CD3+ lymphocytes. Strahlenther Onkol (2005) 181; 326-35

[219] Wojewodzka, M.; Buraczewska, I.; Kruszewski, M.: A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. Mutat Res (2002) 518; 9-20

[220] Wojewodzka, M.; Kruszewski, M.; Iwanenko, T.; Collins, A.R.; Szumiel, I.: Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand breakage. Mutat Res (1998) 416; 21-35

[221] Wojewodzka, M.; Kruszewski, M.; Szumiel, I.: Effect of signal transduction inhibition in adapted lymphocytes: micronuclei frequency and DNA repair. Int J Radiat Biol (1997) 71; 245-52

[222] Wunderlich, G.; Drews, A.; Kotzerke, J.: A kit for labeling of [188Re] human serum albumin microspheres for therapeutic use in nuclear medicine. Appl Radiat Isot (2005) 62; 915-8

[223] Wuttke, K.; Streffer, C.; Muller, W.U.: Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. Mutat Res (1993) 286; 181-8

[224] Wykes, S.M.; Piasentin, E.; Joiner, M.C.; Wilson, G.D.; Marples, B.: Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks. Radiat Res (2006) 165; 516-24

[225] Wyllie, A.H.: What is apoptosis? Histopathology (1986) 10; 995-8

[226] Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.; Currie, A.R.: Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol (1980) 68; 251-306

[227] Zalutsky, M.R.: Current status of therapy of solid tumors: brain tumor therapy. J Nucl Med (2005) 46 Suppl 1; 151S-6S

[228] Zalutsky, M.R.; Bigner, D.D.: Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radioimmunoconjugates. Acta Oncol (1996) 35; 373-9

[229] Zalutsky, M.R.; Reardon, D.A.; Pozzi, O.R.; Vaidyanathan, G.; Bigner, D.D.: Targeted alpha-particle radiotherapy with 211At-labeled monoclonal antibodies. Nucl Med Biol (2007) 34; 779-85

[230] Zalutsky, M.R.; Xu, F.J.; Yu, Y. et al.: Radioiodinated antibody targeting of the HER-2/neu oncoprotein: effects of labeling method on cellular processing and tissue distribution. Nucl Med Biol (1999) 26; 781-90

[231] Zavitsanou, K.; Nguyen, V.; Greguric, I.; Chapman, J.; Ballantyne, P.; Katsifis, A.: Detection of apoptotic cell death in the thymus of dexamethasone treated rats using [123I]annexin V and in situ oligonucleotide ligation. J Mol Histol (2007) 38; 313-9

[232] Zhou, B.B.; Elledge, S.J.: The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature (2000) 408; 433-9

7. Anhang

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien

Antikörper	
anti-Histon H2AX (Ser 139) clone JBW301, 200 µg/ml (mouse monoclonal IgG1)	Biomol, Hamburg
Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG, 2 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
IgG, goat anti rabbit	Invitrogen, Karlsruhe
Radionuklide	
^{188}Re-Perrhenat (^{188}W/^{188}Re-Generator)	Polatom, Otwok-Swierk, Polen
^{211}At-Astatid	Zyklotron MH Hannover, AG Radiochemie
Lymphozyten (PBMC)	Uniklinikum Dresden, Transfusionsmedizin
Sonstige Chemikalien, alphabetisch	
Agarose Sea plaque GTG (low melting point)	Biozym Scientific, Oldendorf
Agarose NEOO	Roth, Karlsruhe
Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit	Alexis Biochemicals
Biocoll Lymphozyten-Trennmedium	Biochrom, Berlin
Benzin, vergällt	Merck, Darmstadt
Bovin serum albumin (BSA)	Sigma, München
Dako-Pen Markierungsstift	Dako, Hamburg
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, München
DMSO	Merck, Darmstadt
Doxorubicin	Sigma, München
Ethanol 80 %	Merck, Darmstadt
Eindeckmedium (mounting medium)	Sigma, München
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FKS	Sigma, München
Formaldehyd 4 %	Apotheke Uniklinikum Dresden
HCl 37 %	Merck, Darmstadt
H_2O dest.	Apotheke Uniklinikum Dresden
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Isopropanol	Merck, Darmstadt

NaCl	Merck, Darmstadt
NaCl 0,9 %, isotonisch	Braun, Melsungen
Na_2EDTA	Merck, Darmstadt
NaOH 40 M	Merck, Darmstadt
PBS, ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}	Biochrom, Berlin
PBS, mit Ca^{2+}, Mg^{2+}	Biochrom, Berlin
Poly-D-Lysin	Biochrom, Berlin
SDS (sodiumdodecylsulfate)	Merck, Darmstadt
SLS (sodiumlaurylsulfate)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Biochrom, Berlin
TBE-Puffer	Sigma, München
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin

7.1.2 Lösungen und Puffer

BSA-Blockingpuffer 10 %	10 g/100 ml in PBS vor Versuch 1:10 verdünnen, steril filtrieren
DAPI	Stammlösung 10 mg/ml Arbeitslösung 1:1000 (10 µl in 10 ml dest. H_2O)
Ethidiumbromid 200 µg/ml	Stammlösung 20 µg/ml Arbeitslösung 1:10 mit dest. H_2O
Elektrophoresepuffer pH 8,3	TBE–Puffer 10x (890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM Na_2EDTA) pH 8,3 vor Gebrauch 1:10 mit dest. H_2O verdünnen
Elektrophoresepuffer pH 13	Stammlösung 10 N NaOH 200 mM Na_2EDTA auf pH 10 einstellen Arbeitslösung 300 ml NaOH 50 ml Na_2EDTA mit dest. H_2O auf 10 l auffüllen, pH ≥13, Leitfähigkeit: 60-65 mS einstellen
Lyselösung pH 10	2,5 M NaCl 100 mM Na_2EDTA (372 g/mol) 10 mM Tris 89 ml Lyselösung mit 1 % Triton X 100 und 10 % DMSO am Versuchstag frisch herstellen
Lyselösung pH 9,5	25 mM Na_2EDTA 87 mM SDS 34 mM SLS
Neutralisationspuffer pH 7,5	Tris 0,4 M mit HCl 37 % auf pH 7,5 einstellen

7.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zellbank	HERA safe, Heraeus instruments,Düsseldorf,Germany
Brutschränke	IG 150, Jouan GmbH, Unterhachingen Binder CB 150, Tuttlingen
Kühlzentrifuge	UNIVERSAL 32R, Hettich Zentrifugen,Tuttlingen
Zentrifugen	Biofuge primo R, Microcentrifuge MC-13, Heraeus instruments, Düsseldorf
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Power Supply	Pharmacia LKB EBS 500/400, Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT System, Biorad München
pH-Meter	Schott-Instruments GmbH, Mainz
Schüttler Multi Reax	Heidolph, Kelheim
Konduktometer LF 197	WTW-GmbH, Melsungen
γ-Counter	Cobra™ II, Auto-gamma, Packard®, Canberra company Australia
Lichtmikroskop CK 2	Olympus-GmbH, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 40, Carl-Zeiss-AG, Oberkochen/Jena
Nalgene-Box	Nunc über VWR International
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger Super Frost plus	Langenbrinck, Emmendingen
Falconröhrchen	Greiner bio one, Frickenhausen
PP-Röhrchen, 14 ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Nunc über VWR International
Partikelzälgerät, CellCounter Modell TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CCD Kamera	BFI Optilas, Puchheim
Durchflusszytometer Facs Scan	Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg

Software Komet 6.0 GLP	Kinetik Imaging, BFI Optilas, Puchheim
Software BD Cellquest Pro	Mac, Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA
SPSS 15.0 Windows	SPSS GmbH, München

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Kotzerke angefertigt habe.

Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form an keiner anderen Stelle zum Zwecke eines Promotions- oder anderen Prüfungsverfahrens eingereicht.

Roswitha Runge

Dresden, den 31.03.2009

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Kotzerke, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin danke ich für die Vergabe des Themas und die intensive und kontinuierliche Betreuung dieser Arbeit. Seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft waren eine motivierende Unterstützung und ein wesentlicher Beitrag zum Gelingen der Arbeit.

Dem Leiter der Arbeitsgruppe Chemie, Herrn Prof. Dr. G. Wunderlich, danke ich für das Interesse am Fortgang der praktischen Arbeiten und für die fachliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. W. Dörr danke ich an dieser Stelle für die unterstützende wissenschaftliche Beratung.

Frau Dr. C. Friesen, Universität Ulm, hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Zeit für anregende Diskussionen insbesondere zum Thema Apoptose, vielen Dank.

Frau Dr. U. Oelschlägel danke ich für die praktische Einführung in die Durchflusszytometrie und die Kooperationsbereitschaft.

Ganz herzlichen Dank an Frau Dr. A. Dörfler für fachlich kompetente Ratschläge, konstruktiven Gedankenaustausch und viele wertvolle Tips.

Danken möchte ich den Mitarbeitern der Klinik für Nuklearmedizin, die mich in verschiedenster Weise unterstützt haben. Dabei geht besonderer Dank an Maria Wendisch für die praktische Unterstützung und anregenden Gedankenaustausch bei biologischen Fragestellungen. Robert Freudenberg und Liane Oehme danke ich für die Diskussion der dosimetrischen Belange.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie Dank für aufmunternde Worte und den Verzicht auf manche gemeinsame Stunde.

Thesen

1. Alle verwendeten Methoden (Komet-Assay, Gamma-H2AX und Annexin V/PI-Durchflusszytometrie) sind geeignet, um DNA-Schäden an humanen Lymphozyten zu messen.

2. Der alkalische Komet-Assay detektierte nach Bestrahlung mit dem Alpha-Strahler ^{211}At geringere Schäden als nach Bestrahlung mit dem Beta-Strahler ^{188}Re. Die von ^{211}At erzeugten Effekte werden aufgrund der Qualität der DNA-Schäden unterschätzt.

3. Der Nachweis der hohen biologischen Wirksamkeit von ^{211}At gelingt besser mit dem neutralen Komet-Assay, der die DSB-Induktion durch ^{211}At reflektiert (10 Gy -110 Gy).

4. Die unterschiedliche Wirksamkeit der Strahlenqualitäten kann auf den Anteil von Einzelstrangbrüchen im Vergleich zu Doppelstrangbrüchen zurückgeführt werden, was insbesondere mit der Kombination der beiden Komet-Assay-Varianten nachweisbar ist.

5. Der Vergleich der Reparaturkapazitäten nach Bestrahlung mit ^{211}At und ^{188}Re im alkalischen Komet-Assay zeigte eine schnelle Reparatur bei ^{188}Re mit Reparaturhalbwertszeiten von 10-15 min. Mit ^{211}At bestrahlte Zellen behalten markante Restschäden bis 20 h nach Exposition.

6. Die Bestimmung des Reparaturvermögens mit dem neutralen Komet-Assay verweist auf einen höheren Anteil residualer DSB nach ^{211}At. Mit ^{188}Re induzierte DNA-Schäden werden zunächst beseitigt (Reparaturhalbwertszeit 20 Gy: 3,6 h). Die Restschäden sind nach 20 h für beide Radionuklide auf gleichem Niveau (70 %).

7. Das Zytostatikum Doxorubicin induziert fast ausschließlich DSB und die biologische Wirkung ist vergleichbar mit der Wirkung von ^{211}At. Die Kinetik der Schadensinduktion ist im Gegensatz zur Kinetik nach Exposition mit ionisierender Strahlung verzögert (Gamma-H2AX).

8. Die Detektion von DSB mit der Gamma-H2AX-Immunfluoreszenz kann die höhere Wirkung des Alpha-Strahlers belegen. Die Methode ist diesbezüglich sensitiver als der neutrale Komet-Assay (0,05 Gy-5 Gy).

9. Die Ergebnisse der Gamma-H2AX-Immunfluoreszenz weisen auf eine deutliche Reduzierung der DSB unabhängig von der Strahlenqualität hin (25 %). Es wird ein Unterschied zur Höhe der residualen DSB im neutralen Komet-Assay festgestellt (70 %).

10. Die Apoptoserate steigt nach ^{188}Re-Bestrahlung dosis- und zeitabhängig bis 44 h. Nach ^{211}At-Applikation werden höhere Apoptoseraten bestimmt, die eine eingeschränkte Dosisabhängigkeit und einen direkten Übergang in die Spätapoptose/Nekrose zeigen.

11. Die Strahlenwirkung (biologische Wirksamkeit) von ^{211}At (LET 97 keV/µm) gegenüber ^{188}Re (LET 0,19 keV/µm) liegt in Abhängigkeit vom Testsystem und dem biologischen Endpunkt bei Werten von 1,3–5,8.

12. Im Gegensatz zum neutralen Komet-Assay ist die sensitive Erfassung von DNA-Schäden an Patienten in physiologisch relevanten Dosisbereichen mit Gamma-H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie zur Erfassung der individuellen Strahlenempfindlichkeit geeignet.